



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓSGRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

Influencia dos fatores de transcrição Hoxa2 e Six2 no desenvolvimento crânio facial e dos fatores de crescimento EGF e FGF2 na diferenciação dos derivados truncais da crista neural

Orientador: Profa. Dra. Andréa Gonçalves Trentin
Universidade Federal de Santa Catarina – CCB – BEG
Co-Orientador: Profa. Dra. Nicole Marthe LeDouarin
Collège de France/CNRS/ Académies des Sciences

Ricardo Castilho Garcez
Departamento de Biologia Celular Embriologia e Genética – BEG
Maio de 2009



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓSGRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

Influencia dos fatores de transcrição Hoxa2 e Six2 no desenvolvimento crânio facial e dos fatores de crescimento EGF e FGF2 na diferenciação dos derivados truncais da crista neural

**Trabalho apresentado como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em
Neurociências**

Orientador: Profa. Dra. Andréa Gonçalves Trentin
Universidade Federal de Santa Catarina – CCB – BEG
Co-Orientador: Profa. Dra. Nicole Marthe LeDouarin
Collège de France/CNRS/ Académies des Sciences

Ricardo Castilho Garcez
Departamento de Biologia Celular Embriologia e Genética – BEG
Maio de 2009

*Dedico em especial esse trabalho a todos aqueles que o lerem e dele retirarem
conhecimento e/ou inspiração para ampliar o conhecimento científico*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Andréa Trentin por ensinar-me a ver, pensar e tentar resolver um problema científico. Por estar sempre disposta a ajudar-me.

À Mme Nicole LeDouarin pelo constante apoio e confiança no meu trabalho. Mas principalmente pela oportunidade que me ofereceu de trabalhar junto ao seu grupo, por ensinar-me a retirar de um trabalho, muito mais do que os dados que este apresenta. Enfim, por partilhar um pouco de sua genialidade.

À Sophie Creuzet pela sua atenção e disponibilidade em verdadeiramente ensinar-me técnicas e conceitos em Biologia do Desenvolvimento.

Aos meus colegas de laboratório aqui no Brasil, sempre entusiasmados e incansáveis tanto na busca por conhecimento, quanto em momentos festivos. Maria Cecília, Talita, Meline, Pâmela, Ellen, Íris, Mari, Ricardo-New, Bruna, Ezequiel, Fernanda, Lucas, Ricardinho, Cynara, Coronel Benedetti, Denise, Gustavo, Zucco, Marco dos Anjos, Beatriz, Rossana, Raul.

Às minhas alunas Suelen, Bianca e Binka, o trio mais competente do laboratório!

Aos meus colegas e amigos de laboratório na França: Hélia Neves, com sua eloquência científica, seu jeito claro de ver e compreender qualquer mecanismo biológico, uma das profissionais mais competentes que conheci e, principalmente, uma das melhores pessoas com quem tive contato, uma amiga fantástica, alegre, companheira sempre. Elisabeth Dupin, com seu perfeccionismo científico, sempre pronta a ajudar, uma cientista muito competente e uma amiga fantástica. Zé Brito por ter prontamente me ensinado os primeiros passos no laboratório. Prof. Giordano Calloni, grande amigo, sempre disposto a encarar uma discussão científico-filosófica, sempre pronto a ajudar, companheiro de jogo de dardo regado a *bière belge* e banco imobiliário, apesar de nunca ganhar! O casal Juliana e Diego, amigos dispostos a qualquer coisa para ajudar, pessoas sinceras e que tenho certeza, com um futuro científico brilhante.

À minha família francesa, a mãe Renata, carinhosa e dura ao mesmo tempo com quase todos os filhos, exceção ao Tonho! Uma pessoa realmente especial que terei sempre guardada no meu coração. O padrasto Marco, vulgo Oxy, dono do maior coração do mundo, sempre de bom humor, excelente cantor, quando crescer, serei como você Marco! Meu irmão Presidente, André, o primeiro grande amigo que fiz em Paris, companheiro, equilibrado, sempre com o conselho certo,

pessoa íntegra. Cheguei, sinceramente, a pensar em me aventurar no futebol, depois de um dia ouvi-lo dizer: “*Minha maior tristeza é o Catarina não gostar de bola, queria você com a gente*”. Ainda aprendo meu irmão. Meu irmão Antônio, vulgo Tonho, cara chato, resmungão que sabe sequer fumar, mas sem dúvida uma excelente companhia, pessoa brilhante, dono de uma inteligência que nem mesmo ele sabe quão grande é. Um dia, ainda, te darei aquele ensaio Castro *et al.* que fiquei te devendo. Cris, meu irmão mais equilibrado, mais justo, mais bêbado, outro dotado de uma inteligência admirável, companheiro de verdade, pra todas as horas, mesmo para correr às 4 da manhã a 5 graus. Às minhas irmãs: Sara, bichinho chato, mas adorável, ciumenta com os irmãos, mas dona de uma coração mole, amiga sempre sincera, quase sempre justa. Taysa, minha irmãzinha mais alegre, animada, observadora, esperta, inteligentíssima, sempre prática, a Tatuzinha! À recém anexada Marina, minha auxiliar em surpresas! Essa tese tem um pedaço de cada um de vocês, obrigado a todos! Vocês são realmente especiais para mim.

Ao Irmão Bruno Caetano, vulgo Urus que injustamente não foi admitido como filho na família, mas que se tornou o coração dessa família. A tua alegria, teu coração enorme, teu jeito, tudo isso faz de ti um grande homem, o melhor deles.

À Carol, uma mulher incrível, dona da voz mais bonita que já ouvi. Amiga especial e companheira insubstituível!

Aos grandes amigos que fiz na Maison Du Brésil Nashira, Elaine, Mariana, Priscila, Grazi, Peri, Fábio, Esther, Artur, Picão & Falcon, Carlinda, Gisele (pretinha), Rafael, Aline, Suzana, Keyla, Fabíola, Bárbara, Sergio, Carol, Alex, Tayná, Ricardo (bolinha de meia), Óliver, Renata, Gyselle, Alexandra, Ricardo, Luiza, Flávia, Flavinho, Cintia Han, Fran, Rodrigo (da B), Lucas, Danilo.... enfim, todo aquele pessoal maravilhoso!

À mes amies françaises Claire et Florance ; hongroise Dóra ; norvégienne Daniela ; portugaise Teresa ; romain louan ; américain Ilia. Je pense bien à vous toujours, vous êtes dans mon cœur ! Merci beaucoup mes amies pour les morceaux de vie que vous m’ont donnée.

À família Borba-Pamplona, minha segunda família. Ao Seu Jacir por ser um exemplo de pai para mim, por acreditar em mim sempre, pelo carinho, pela amizade, pelas cavalgadas, jantares em família. À D. Maurina, pelo carinho enorme que tens por mim, por ter sido minha mãe muitas vezes. Ao Guilherme e Humberto pelo companheirismo e amizade. À Ana Laura, a irmã mais nova que sempre quis ter. Aos meus compadres Sérgio e Jussara pelos momentos especiais e alegres que passamos juntos. Aos pequeninhos, Helena minha gatinha linda, eu morro de saudades de ti

linda!! O Tio Ricardo te adora! Ao meu afilhado de coração Arthur. À Sabrina, pessoa que sem dúvida nenhuma, mais me ajudou pessoalmente durante a realização desse doutorado, a quem mais devo agradecer. Você foi quem mais me fez crescer como pessoa. Dedicarei para sempre um carinho especial a você.

Aos amigos das antigas que ficarão para sempre, Claudia Nedel, Marco Stimamiglio, Tiago Goss e Bruno Costa amigos especiais que sem duvida nenhuma estarão entre os melhores cientistas do país.

Às minhas amigas especiais Bia, Bruna P. e Pri vocês entraram na minha vida e aqui ficarão para sempre. Vocês são mulheres lindas e especiais. Inteligentes, espertas. Mulheres perfeitas! Adoro vocês!!!

À minha família pelo carinho, amor e amizade incondicionais que sempre me derem. Minha mãe Gilda por ter feito de mim o que sou; minha irmã Alessandra por muitas vezes mostrar-me o quão errado estava e ao meu pai Olegário por ensinar a nunca desistir.

Aos meus grandes amigos e companheiros de casa, Eric e Gabriel, pela amizade e companheirismo sempre.

A todos meus amigos que me conhecem bem e sabem que não ousaria listar-lhes os nomes.

Ao Nivaldo, por estar sempre disposto a ajudar nos trâmites burocráticos e pela força especial que me deu no início do doutorado.

A CAPES, CNPq, Fondation des Treilles, EGIDE pelo financiamento pessoal para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	IX
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XI
RESUMO.....	XII
ABSTRACT.....	XIII
1- INTRODUÇÃO.....	01
1.1- Origem embrionária e indução da crista neural.....	05
1.2- Migração e diferenciação das células da crista neural.....	09
1.2.1- Migração da CN cefálica.....	12
1.2.2- Migração da CN truncal.....	14
1.3- Origem evolutiva da CN.....	15
1.4- A crista neural e o complexo craniofacial.....	19
1.5- A crista neural como centro sinalizador.....	21
2- JUSTIFICATIVA.....	29
3- OBJETIVOS.....	30
3.1- Objetivo Geral.....	30
3.2- Objetivos específicos.....	30
4- MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1- Microcirurgia em embriões em estágio de nêurula.....	32
4.2- Expressão ectópica de <i>Hoxa2</i> na CNFE.....	32
4.3- Bloqueio da expressão de <i>Six2</i> utilizando <i>Six2</i>-dsRNA.....	33
4.4- Análises de expressão in vitro por RT-PCR.....	35
4.5- Imunohistoquímica em embriões inteiros.....	36
4.6- Hibridização <i>in toto</i>.....	37
4.7- Coloração para cartilagem em embrião inteiro.....	37
4.8- Cultura de células de crista neural de codornas.....	38
4.9- Imunocitoquímica.....	38
4.10- Análise estatística.....	39
5- RESULTADOS.....	40
5.1- A expressão forçada de <i>Hoxa2</i> na CNFE promove alterações no padrão molecular durante o desenvolvimento da cabeça.....	40
5.1.1- Análise da proliferação e migração da CN em embriões CNFE-<i>Hoxa2</i>⁺	40

5.1.2- Influência da expressão ectópica de <i>Hoxa2</i> na CNFE sobre a expressão dos morfógenos, <i>Fgf8</i> , <i>BMP4</i> , <i>Shh</i> e <i>Wnt8b</i>	43
5.1.3- Expressão ectópica de <i>Hoxa2</i> regula negativamente a expressão de antagonistas de BMP na FNSC.....	45
5.2- O bloqueio na expressão de <i>Six2</i> na CNFE promove alterações morfológicas e moleculares semelhantes à expressão forçada de <i>Hoxa2</i>	47
5.2.1- Padrão de expressão de <i>Six2</i> durante o desenvolvimento da região anterior de embriões de <i>Gallus gallus</i>	47
5.2.2- A expressão endógena de <i>Six2</i> na CNFE é inibida pela expressão ectópica de <i>Hoxa2</i>	49
5.2.3- O bloqueio da expressão normal de <i>Six2</i> na CNFE promove alterações moleculares semelhantes à expressão forçada de <i>Hoxa2</i>	50
5.2.4- O bloqueio na expressão de <i>Six2</i> nas células da CNFE promove alterações no desenvolvimento do prosencéfalo.....	54
5.2.5- O bloqueio na expressão de <i>Six2</i> na CNFE promove malformações crânio-faciais....	56
5.3- A diferenciação das células da CN truncal pode ser modulada, <i>in vitro</i> , pela utilização de fatores de crescimento.....	58
6- DISCUSSÃO.....	63
7- CONCLUSÕES.....	72
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 01:	Sistema de quimeras galinha-codorna desenvolvido por Nicole LeDouarin.....	04
Tabela 01:	Tipos celulares e órgãos derivados da CN, total ou parcialmente.....	05
Figura 02:	Indução da CN.....	08
Figura 03:	Migração da CN cefálica e truncal.....	11
Figura 04:	Formação ossos crânio faciais e a expressão dos genes <i>Hox</i>	13
Figura 05:	Árvore filogenética e características associadas ao surgimento das estruturas craniofaciais.....	18
Figura06:	A ablação da CN cefálica leva a não formação do telencéfalo.....	23
Figura 07:	Representação evolutiva do surgimento da CN x formação da mandíbula.....	25
Figura 08:	Expressão forçada do gene <i>Hoxa2</i> e ablação da crista neural facial e esqueletogênica (CNFE), promovem alterações no desenvolvimento de estruturas craniofaciais.....	27
Figura 09:	Representação esquemática do processo de eletroporação bilateral.....	33
Tabela 02:	<i>Primers</i> utilizados para amplificação por RT-PCR.....	36
Figura 10:	Perfil de migração das células da CN e proliferação celular geral em embriões CNFE- <i>Hoxa2</i> ⁺	42
Figura 11:	Influência da expressão forçada de <i>Hoxa2</i> na CNFE sobre a expressão de <i>FGF8</i> , <i>BMP4</i> , <i>Shh</i> , <i>Wnt-8b</i>	44
Figura 12:	Efeito da expressão forçada de <i>Hoxa2</i> na CNFE sobre a expressão de <i>Noggin</i> , <i>Cerberus</i> e <i>DAN</i>	46
Figura 13:	Padrão normal de expressão de <i>Six2</i> durante o desenvolvimento. Em embriões com 25ss – E2.....	48
Figura 14:	Efeito da expressão forçada de <i>Hoxa2</i> e do bloqueio de <i>Six2</i> , sobre a expressão de <i>Six2</i>	49
Figura15:	Efeito do bloqueio da expressão de <i>Six2</i> na CNFE sobre a expressão de <i>FGF8</i> , <i>BMP4</i> , <i>Shh</i> , <i>Wnt-8b</i>	51
Figura 16:	Influência do bloqueio da expressão <i>Six2</i> na CNFE sobre expressão de <i>Noggin</i> , <i>Cerberus</i> e <i>DAN</i>	53
Figura 17:	O bloqueio na expressão de <i>Six2</i> na CNFE provoca malformações no SNC.....	55
Figura 18:	A redução na expressão de <i>Six2</i> pelas células da CNFE, durante a fase de migração, leva a malformações esqueletogênicas.....	57

Figura 19:	Visão macroscópica das células pigmentares derivadas da CNT em cultura.....	59
Figura 20:	Imagem ilustrativa dos derivados da CNT após tratamento com EGF e/ou FGF2.....	61
Figura 21:	Análise quantitativa dos efeitos do EGF e FGF2 na diferenciação das células da CNT.....	62
Figura 22:	Esquema representativo do mecanismo de ação de <i>Six2</i> na CNFE e sua relação com <i>Hoxa2</i>	69
Figura 23:	Efeitos do EGF e FGF2 sobre a diferenciação dos progenitores da crista neural truncal.	71

LISTA DE ABREVIATURAS

Ar- cartilagem articular
ANR- região neural anterior
BA- arco branquial; BA1 – primeiro arco branquial; BA2 – segundo arco branquial etc.
BMP- proteína morfogenética do osso
CCN- células da crista neural
Cmm- comissura maxilo-mandibular
CN- crista neural
CNFE- crista neural facial e esquelotogênica.
CNT- crista neural truncal
Di- diencéfalo
Dig- digoxigenina
dsRNA- RNA de dupla-fita
dsSix2- RNA de dupla-fita para *Six2*
E- embrião; E5 – embrião com 5 dias de desenvolvimento.
Ea- endoderme anterior
EE- extrato de embrião
EGF- fator de crescimento epidermal
FGF- fator de crescimento de fibroblasto
FITC- isotiocianato de fluoresceína
HH- Hamburger & Hamilton – referente aos estágios do desenvolvimento embrionário de frangos
M- cartilagem Meckel
MEC- matriz extracelular
Mes- mesencéfalo
Nf- cartilagem nasofrontal; pode se referir também a região nasofrontal em embriões jovens
pb- pares de bases
PBS- tampão fosfato salino
phH3- histona H3 fosforilada.
Pm- processo maxilar
Pnf- processo nasofrontal
Q- cartilagem quadrada
r- rombômero; r1- primeiro rombômero; r2- segundo rombômero etc
Ro- retro-orbital
SFB- soro fetal bovino
Shh- sonic hedgehog
SMA- actina de músculo liso
SMP- proteína específica de mielina
SNP- sistema nervoso periférico
ss- somitos
Te- telencéfalo
TGFβ- fator de crescimento transformador - beta
TH- tirosina hidroxilase
TRITC- isotiocianato de tetrametilrodamina
VO- vesícula óptica
Vot- vesícula ótica
βIIITub- beta-Tubulina III

RESUMO

A crista neural (CN) representa um grupo de células transientes durante o desenvolvimento dos craniatas. Essas células estão localizadas nas bordas dorsais do tubo neural, ao longo de todo eixo ântero-posterior do embrião. A CN sofre transição epitélio-mesenquimal, suas células tornam-se altamente migratórias e seguem rotas distintas por todo o embrião. A CN é postulada pela maioria dos pesquisadores como o grande passo evolutivo que permitiu aos vertebrados desenvolverem a cabeça, porém os mecanismos moleculares que envolveram esse processo são obscuros e instigantes.

Esse trabalho tem por objetivo estudar as relações entre os fatores de transcrição *Hoxa2* e *Six2* no desenvolvimento da cabeça e os efeitos dos fatores de crescimento epidermal (EGF) e de fibroblasto (FGF2) na diferenciação dos derivados da CN truncal.

Nossos resultados demonstram que o fator de transcrição *Six2*, expresso normalmente na CN cefálica, mostrou-se capaz de controlar a expressão de antagonistas de BMPs, como *Noggin* e *DAN* e também do antagonista da via TGF β , *Cerberus*. Quando expresso ectopicamente na CN cefálica, o gene *Hoxa2* suprime a expressão de *Six2*, levando a uma redução na expressão de *Noggin* e *DAN*. Isso acarretará num aumento da biodisponibilidade de BMP4, promovendo redução na expressão de *FGF8* na região neural anterior. Além disso, a redução na expressão de *Six2* promove um ganho de expressão de *Cerberus* pelas células da CN periocular e maxilar. Esse cenário molecular inviabilizará o desenvolvimento dos derivados condro-osteogênicos da CN e, surpreendentemente do sistema nervoso central. Com base nesses resultados, pode ser sugerido que o surgimento de uma CN que não expressa genes *Hox* e que expressa o gene *Six2* permitiu a formação de um cenário molecular fundamental para a formação da cabeça.

Além disso, analisamos os efeitos de fatores do microambiente na diferenciação da CN truncal de codorna, em cultura. Demonstramos pela primeira vez que EGF induz a diferenciação da CN para o fenótipo neuronal e melanocítico enquanto que FGF2 promove a diferenciação da CN para o fenótipo glial. Nossos resultados sugerem que FGF2 favorece a gliogênese enquanto que EGF promove a neurogênese e melanogênese, e assim podemos propor que estes fatores apresentam um importante envolvimento no desenvolvimento do sistema nervoso periférico

ABSTRACT

The neural crest (NC) is a transient structure of the vertebrate embryo formed by the lateral borders of the neural primordium. Its constitutive cells after losing their epithelial arrangement migrate away through embryonic tissues to stop at elected sites where they differentiate into a large variety of cell types. The migration routes of the NC cells or their derivatives are well known. However, the mechanisms of NC induction, delimitation and differentiation are not well elucidated. The NC is claimed as the great evolution step that allowed the vertebrates develop the head, although the molecular mechanisms involved in this process are unknown.

In the present work we are interested in study the molecular mechanisms involved in the formation of NC-derived-skull-face structures as well as the microenvironmental factors involved in NC differentiation in quail.

We verified that the transcription factor *Six2* is normally express in the cephalic NC, in vivo. *Six2* is able to control the expression of antagonist of BMPs, such as *Noggin* and *DAN* and also, the antagonist of TGF β pathway, *Cerberus*. When ectopically expressed in the cephalic NC, *Hoxa2* gene suppresses the *Six2* expression leading to a decreased expression of *Noggin* and *DAN*. These promoted an increase in the expression of BMP4 and consequently reduction in the *FGF8* expression in the anterior neural ridge. Moreover, the reduction in the *Six2* expression promoted a profit of expression of *Cerberus* for the NC cells to periocular and to maxillary regions. This molecular scene will make impracticable the development of the condro-osteogenic derivatives of the CN and, surprisingly of the SNC. Taken together, these results might suggest that the appearance of the NC Hox-negative and Six-positive was fundamental to the head development.

In addition, we further investigate the effect of microenviromental factors on quail trunk NC development in culture. We show for the first time that EGF induces the differentiation of NC to the neuronal and melanocytic phenotypes. On the other hand, FGF2 promotes NC differentiation to Schwann cells. Our results suggest that FGF2 is favoring the gliogenesis while EGF is promoting neurogenesis and therefore, we might propose an important involvement of these growth factors in the fate decision of NC progenitors and in the development of the peripheral nervous system.

1- INTRODUÇÃO

A crista neural (CN) é uma estrutura discreta formada por apenas poucas células e de maneira transitória nas fases iniciais do desenvolvimento embrionário, ela personifica um dos capítulos mais importantes da Biologia do Desenvolvimento. A CN corresponde a um grupo de células altamente pluripotentes que participam da formação de ossos, tendões, tecidos conjuntivos, tecido adiposo, derme, sistema nervoso periférico e glândulas. As células da CN são formadas na região dorsal do tubo neural, num gradiente rostro-caudal durante a neurulação. Adquirindo propriedades mesenquimais, as células da CN migram por rotas distintas de maneira tempo-específica até chegarem ao seu sítio final de diferenciação. A CN intriga os pesquisadores há mais de 150 anos com questões que até hoje continuam sem uma resposta definitiva. Como é induzido esse comportamento migratório da CN? Quais os sinais que essas células precisam para moverem-se em rotas tão específicas? O que as faz parar de migrar e diferenciar? Essas questões estão entre os mais intrigantes problemas da Biologia do Desenvolvimento (LeDouarin & Kalcheim, 1999; LeDouarin *et al.*, 2008).

Em 1868, Wilhelm His (1831-1904), um embriologista suíço identificou uma banda transitória de células entre o tubo neural e a ectoderme de embriões de *Gallus gallus* no estágio de nêurula. Ele sugeriu que estas células responsáveis pela formação dos gânglios espinhais e craniais. His chamou esta banda de células de *Zwischenstrang* – o cordão intermediário. Arthur Milnes Marshall (1852-1893) foi quem utilizou pela primeira vez o termo “*crista neural*” (CN) em seu artigo sobre o desenvolvimento de órgãos olfatórios. Este autor descreveu com detalhamento o processo de migração das células da CN a partir das bordas do tubo neural após seu fechamento, durante a neurulação, além de confirmar o seu envolvimento na formação dos gânglios cervicais e dorsais. Na década de 1890, Julia Platt demonstrou que a cartilagem craniofacial, a cartilagem dos arcos branquiais e as células que formam a dentina, também eram de origem da CN que migrava a partir das bordas do tubo neural na região cefálica. Todavia suas idéias tiveram pouca aceitação na época.

Seu trabalho foi bastante criticado por seus colegas homens, ao ponto dela não ter conseguido uma posição acadêmica na Europa e nem nos EUA nos anos que seguiram (Hall, 1999).

50 anos depois de sua publicação, as teorias de Platt foram demonstradas novamente por Sven Hörstadius, Sven Sellman e Gavin de Beer e finalmente aceitas. Estes autores demonstraram que as células da CN participam da formação do esqueleto craniofacial. Além disso, verificaram que este fenômeno podia ser observado em todas as classes de vertebrados. Na década de 1960, vários pesquisadores passaram a se interessar pelos mecanismos de migração e diferenciação das células da CN. Várias vias de migração foram descritas em anfíbios e mamíferos, mas devido à falta de uma metodologia apropriada, freqüentemente os resultados eram discordantes (Hall, 1999).

No ano de 1969, Nicole LeDouarin verificou que o núcleo interfásico das células de galinha e de codorna apresentavam diferenças em relação à condensação da cromatina (LeDouarin, 1969). As células de codorna apresentam a cromatina nuclear mais condensada do que a cromatina dos núcleos das células de galinha (Fig. 01). Baseados nessas diferenças, o grupo de Nicole LeDouarin passou a realizar uma série de implantes de tecido embrionários de codorna em embriões de galinha. As células da codorna poderiam ser facilmente identificadas mesmo algum tempo depois. Com essa metodologia, foi possível criar uma poderosa ferramenta não só para o estudo da Biologia da CN, mas para vários fenômenos em Biologia do Desenvolvimento. O grupo de Nicole LeDouarin realizou vários experimentos onde transplantes de fragmentos do tubo neural, antes da migração das células da CN, foram enxertados ao longo de todo eixo ântero-posterior do embrião. Isso permitiu que as rotas de migração e o destino final das células da CN fossem mapeados precisamente. Os mapas de destino das células da CN foram estabelecidos durante a década de 1970. As diferentes potencialidades da CN ao longo do eixo ântero-posterior foram colocadas em evidência. A CN cefálica (células da CN que migram a partir do prospectivo diencéfalo até o rombômero 8 – r8) dá origem a condrócitos, osteócitos, adipócitos, odontoblastos, células musculares lisas, células gliais, neurônios e melanócitos, sendo a região com maior potencialidade. A CN truncal (CN que migra a partir do r8 até a região caudal) não apresenta o potencial condro-

osteogênico *in vivo*, todavia é ela que dá origem aos neurônios e às células gliais de grande parte do sistema nervoso periférico, além de participar na formação da glândula adrenal (LeDouarin & Kalcheim, 1999; LeDouarin, 2008). Durante as décadas de 1980 e 1990 várias sub-populações da CN foram identificadas. Algumas dessas, associadas aos diferentes rombômeros diretamente relacionadas ao padrão segmental de expressão dos genes *Hox*. Com os avanços no conhecimento do código de genes *homeobox Hox* e sua direta relação com os padrões de migração e diferenciação da CN, foi possível realizar estudos filogenéticos e explicitamente testar hipóteses evolutivas (Hall, 1999; LeDouarin & Kalcheim, 1999).

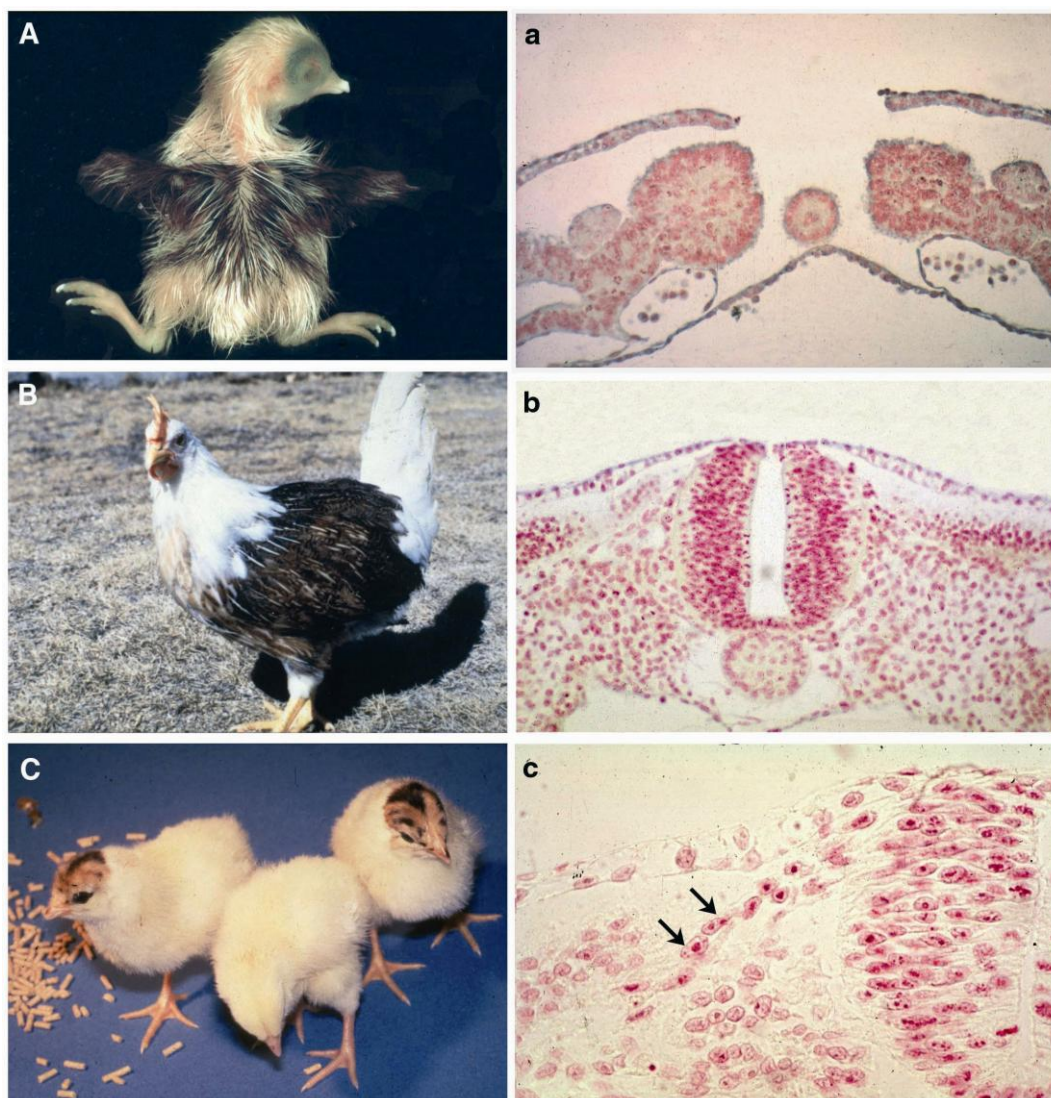


Figura 01. Sistema de quimeras galinha-codorna desenvolvido por Nicole LeDouarin. **A, B, C,** Exemplos de galinhas que tiveram diferentes regiões do tubo neural de codorna transplantada durante a fase embrionária, antes da migração das células da CN. Como a CN também dá origem as células pigmentares é possível identificar o nível em que o transplante de CN foi realizado, pela diferença na pigmentação. **A e B** torácico, **C** cefálico. Como o transplante de tecido é realizado antes da formação do timo, não há rejeição. Nas imagens **a, b, c** cortes histológicos representando várias etapas do processo de transplante de CN. **a.** corte mostrando a remoção do tubo neural. **b.** corte de um embrião na região truncal no momento da migração das células da CN. Os núcleos das células que tubo neural e CN apresentam a cromatina mais densa (de codorna), em relação o tecido hospedeiro (galinha). **c.** detalhe mostrando as células da CN migrando (setas). Imagens gentilmente cedidas por Nicole LeDouarin.

1.1-Origem embrionária e indução da crista neural

Classicamente descreve-se que a CN presuntiva forma-se nas bordas do tubo neural durante o processo de neurulação. As células da CN sofrem uma transição epitélio-mesenquimal mesmo antes do fechamento total do tubo neural. A partir desse momento, estas células realizam o processo de delaminação, desprendem-se do neuroepitélio de origem, assumindo um fenótipo migratório como células isoladas. Nesse momento, é iniciada uma extensiva migração dessas células por todas as partes do embrião, onde passarão a formar uma grande quantidade de tipos celulares em diversos órgãos e estruturas do corpo, entre eles, células gliais do sistema nervoso periférico (SNP), neurônios periféricos, células pigmentares e grande parte do esqueleto crânio-facial (Tab. 01).

Tabela 01. Tipos celulares e órgãos derivados da CN, total ou parcialmente (modificado de Hall, 1999).

Tipos Celulares	
Neurônios sensoriais	Melanócitos
Neurônios adrenérgicos	Osteoblastos, osteócitos
Neurônios colinérgicos	Fibroblastos
Células de Rohon-Béard	Mioblasto estriado
Células de Schwann	Células C produtoras de calcitonina
Células cromafins	Condroblastos, condrócitos
Células satellites	Odontoblastos
Células gliais	Mesênquima cardíaco
Células parafoliculares	Músculo liso
Células mesenquimais	Adipócitos
Angioblastos	
Tecidos e órgãos	
Gânglios espinhais	Sistema nervoso parassimpático
Corpo ultimobranquial	Sistema nervoso periférico
Glândula tireóide	Sistema nervoso simpático
Glândula adrenal	Esqueleto crânio-facial
Dente	Dentina
Tecido conjuntivo	Tecido adiposo
Músculo liso	Músculo estriado
Septo cardíaco	Derme
Olho	Córnea
Endotélio	Vasos sanguíneos
Coração	Tecido conjuntivo de glândulas (tireóide, paratireóide, timo, pituitária, lacrimal)
Encéfalo	

Em aves, o padrão clássico de indução da CN estabelece que a mesma seja especificada durante a formação da placa neural, nas bordas do tubo neural em formação. Os fatores que participariam dessa especificação, como BMPs (proteína morfogenética de osso), Wnts, TGF β (fator de crescimento tumoral beta), FGF (fator de crescimento de fibroblasto), Shh (Sonic hedgehog), entre outros, são produzidos pelos diversos tecidos embrionários que interagem de maneira específica para limitar a formação da CN nas bordas do futuro tubo neural (Fig. 02, A) (Liem, *et al.*, 1995; Litsiou *et al.*, 2005). Essa visão é suportada por experimentos em que a sobreposição de tecidos embrionários, como a ectoderme neural e a ectoderme não-neural, foi capaz de mimetizar a formação da CN, mesmo em sites distantes de sua posição embrionária original (Selleck & Bronner-Fraser, 1995). BMPs e Wnts são capazes de substituir a ectoderme não-neural nesses experimentos induzindo a especificação da CN a partir de tecido da placa neural (Garcia-Castro, *et al.*, 2002). No entanto, recentes evidências sugerem que a CN presuntiva em embriões de aves é especificada ainda durante a gastrulação, antes mesmo de haver uma ectoderme neural e não-neural bem definida (Basch, *et al.*, 2006). Essa especificação precoce da CN sugere que a indução da mesma inicie muito antes do que classicamente tem sido descrito. Mesmo durante a formação da placa neural, o domínio que contém a CN presuntiva e os precursores do tubo neural dorsal não podem ser distinguidos, formando uma única linhagem de células. Esses dados sugerem que as células da CN tornar-se-ão uma população distinta do tubo neural dorsal somente depois da delaminação (Bronner-Fraser & Fraser, 1988). Entretanto a CN e as células da região dorsal do tubo neural já se encontram especificadas na fase de gástrula (Basch, *et al.*, 2006).

Utilizando um sistema de posicionamento de alta precisão de marcadores vitais em embriões de aves no estágio de gástrula, seguido de um acompanhamento em tempo real do desenvolvimento embrionário, Ezin e colaboradores (2009) demonstraram que as células que darão origem à placa neural encontram-se numa posição mais posterior do que a esperada. Por outro lado as células que originarão as bordas da placa neural e a CN surgem como uma banda mais larga do que descrito inicialmente por Basch e colaboradores (2006). Mais interessante ainda, esses autores

observaram que essas células realizam um percurso bastante sinuoso e bem característico até o momento do seu posicionamento final. Provavelmente, por essa razão os mapas de destino da CN, propostos até então, apresentavam tantas discordâncias (Fig. 02, B).

Os BMPs e o fator de transcrição Pax7 são moléculas que têm sido classicamente envolvidas com os estágios iniciais da formação da CN (Liem, *et al.*, 1995). Existe uma sub-população das células da CN que aparentemente apresenta uma indução precoce (estágios 3-4HH; Basch, *et al.*, 2006). Essas células formarão a CN e a porção dorsal do tubo neural do rombencéfalo rostral e mesencéfalo. Desde a gastrulação, estas células expressam tanto *BMP4* quanto *Pax7* (Ezin, *et al.*, 2009). Durante a fase de gástrula, um grupo de células da CN presuntiva localiza-se lateralmente, distante do mesoderma que está invaginando e provavelmente compreende uma população de células da CN que é especificada mesmo na ausência do mesoderma (Basch, *et al.*, 2006; Ezin *et al.*, 2009). Essa possibilidade de especificação da CN precede ao descrito no modelo clássico de indução, em que as interações entre a placa neural, ectoderme e mesoderme durante formação da placa neural são determinantes para o processo (Fig. 02, A)(Meulemans & Bronner-Frase, 2005; Basch, *et al.*, 2004). Considerando a CN como um todo, desde a região cefálica até a região mais caudal, provavelmente o que ocorre é um misto de processos indutivos envolvendo a especificação na fase de gástrula e uma indução mais tardia dependente da sinalização do mesoderma (Ezin, *et al.*, 2009). Independente do tipo de processo de indução que as células da CN sofreram, a ativação de um grupo de fatores de transcrição distintos será o ponto de partida para todas as demais alterações que seguirão nestas células, estes são: Snail, AP2, FoxD3, Twist, Id, Sox9, Sox10 e c-Myc, chamados também de “genes especificadores da CN” (Meulemanas & Bronner-Frase, 2004). Esses fatores de transcrição passam a regular uma cascata de outros genes-alvos culminando no processo de migração e diferenciação final das células da CN.

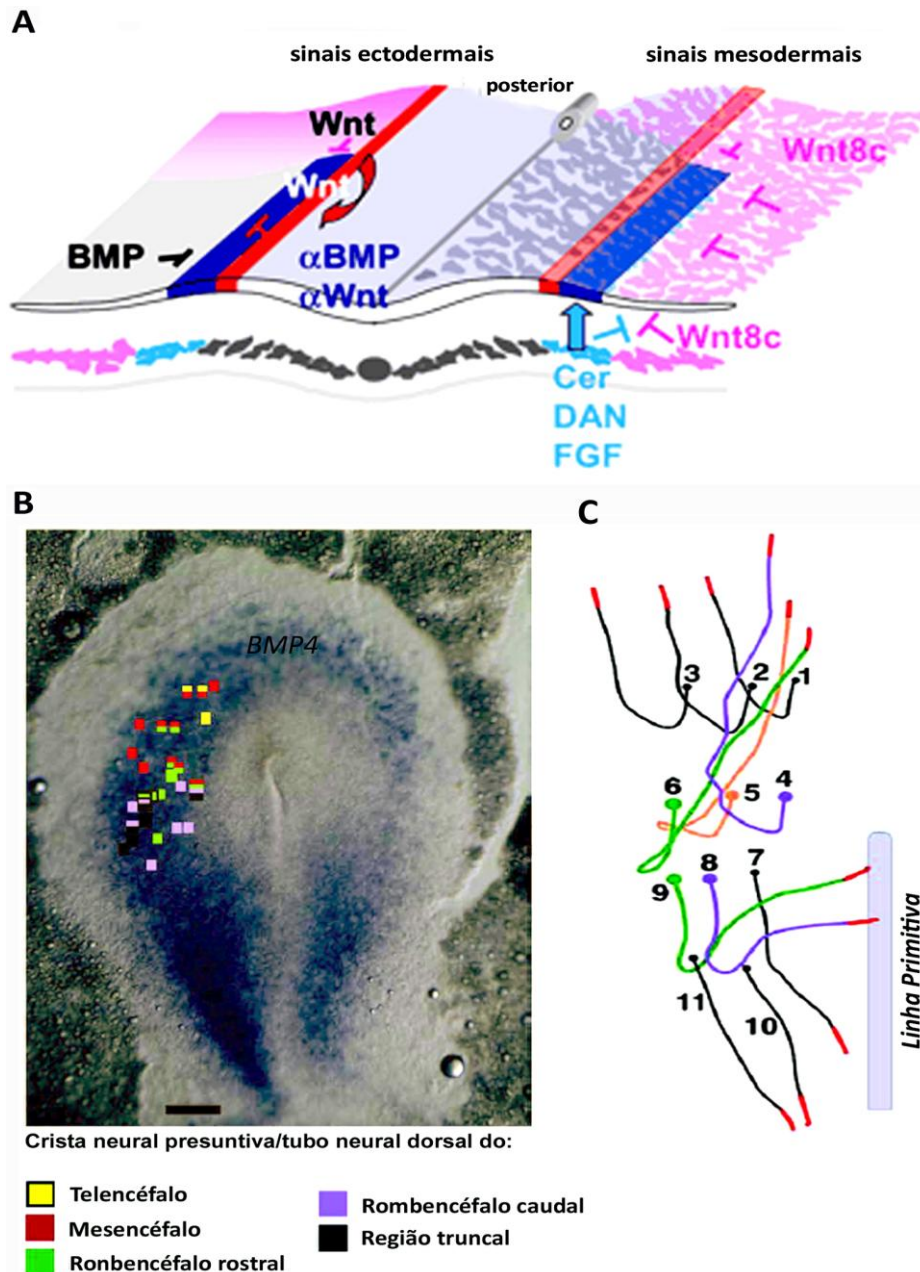


Figura 02. Modelos do processo de indução da CN. Visão clássica do processo de indução da CN (**A**), onde os mesmos fatores que participam da indução neural estariam limitando a especificação das células da CN às futuras bordas do tubo neural. **B.** Proposta atual que demonstra que as células da CN já se encontrariam especificadas durante a gastrulação, sendo BMP4 o principal fator envolvido nesse processo. Os pontos coloridos indicam a localização, na fase de gástrula, das futuras células da CN e região dorsal do tubo neural nos vários níveis ântero-posterior. **C.** Rotas migratórias sinuosas que as células da futura CN e região dorsal do tubo neural seguem durante a gastrulação. Os números de 1 a 10 representam os pontos de partida dessas células. Os seus destinos finais estão determinados pelo esquema de cores apresentado em **B**. Modificado de Meulemans & Bronner-Fraser, 2004 e Ezin *et al.*, 2009.

1.2-Migração e diferenciação das células da crista neural

O estudo de qualquer processo de migração seja ele de células da CN, células tumorais, ou de aves migratórias, deve basear-se em tentar esclarecer os seguintes pontos: **a)** como o processo de migração é iniciado; **b)** como ocorre o reconhecimento da rota migratória; **c)** como ocorre o reconhecimento do destino final. Esses pontos devem ser considerados dentro de um sistema de reconhecimento entre célula migratória e ambiente, de maneira tempo-específico muito precisa.

O início do processo de migração das células da CN ainda não é totalmente conhecido. Sabe-se que a partir da especificação da CN, uma série de fatores de transcrição passa a ser ativado. Estes fatores por sua vez, estimulam a expressão de moléculas como RhoB, responsável por promover alterações no citoesqueleto da célula, preparando-a para o processo migratório (LeDouarin & Kalcheim, 1999). Como inicialmente as células da CN estão fortemente aderidas às demais células do neuroepitélio, a perda na expressão de N-caderinas promovida pelo fator de transcrição Slug é um passo fundamental para o início do processo de migração (Akitaya & Bronner-Fraser, 1992).

A presença de moléculas de matriz extracelular (MEC) é fundamental para determinar as rotas de migração das células da CN. Combinações específicas de moléculas da MEC aliado a fatores solúveis quimiotáticos guiam de maneira específica as células da CN nos seus mais diversos destinos (Löfberg *et al.*, 1985). A microinjeção de anticorpos neutralizantes para fibronectina, laminina e sulfato de heparan na região cefálica de embriões de *Gallus gallus* foi capaz de provocar grandes problemas de migração das células da CN (Bronner-Fraser & Lallier, 1988). Moléculas como a fibronectina, laminina, colágenos, tenascina e vários proteoglicanos e são permissivas à migração das células da CN. Por outro lado, outro grupo de proteínas como as Efrinas impedem a migração das células da CN (Wang & Andreson, 1997). Todavia, de nada adiantaria o embrião apresentar todo um sistema para guiar as células da CN se essas não fossem capazes de reconhecê-lo no momento apropriado. O reconhecimento das proteínas da MEC, de maneira geral, é realizado pelas integrinas. As várias subunidades desse tipo de receptor de superfície celular recombina-se de maneira a reconhecer várias proteínas da MEC de maneira específica. Além das integrinas, a CN é capaz de

expressar distintos receptores de efrinas que quando ativados promovem alterações no citoesqueleto impedindo a migração celular (Krull *et al.*, 1995).

Durante o processo de migração, as células da CN são expostas a uma série de fatores solúveis e elementos da MEC que começam a direcionar o processo de diferenciação destas células. Uma vez no destino final, as células da CN recebem a sinalização para que assumam o seu fenótipo final. Pouco se sabe sobre os mecanismos que determinam o destino final das células da CN. Na formação dos gânglios de raiz dorsal, o gradiente bastante específico entre BMPs produzidos na região dorsal, Shh e Nodal produzidos na notocorda e Noggin produzido pela porção proximal do somito, determinarão a exata posição do gânglio. Quaisquer alterações nestes centros sinalizadores provocam uma posição ectópica do gânglio de raiz dorsal (Teillet *et al.*, 1998). Esses dados mostram que as células da CN são capazes de responder a gradientes de fatores solúveis de maneira muito precisa, determinando o seu destino final. Muitos outros fatores solúveis presentes no microambiente embrionário participam da diferenciação das células da CN. Entre esses fatores têm sido demonstrado que o fator de crescimento de fibroblasto 2 (FGF2) é capaz de estimular a sobrevivência, a proliferação (Kalcheim, 1989; Murphy *et al.*, 1994) e a migração das células da CNT (Kubota *et al.*, 2000). Além disso, tem sido relatado que o FGF2 é capaz de promover a condrogênese, esqueletogênese e gliogênese a partir da CN de aves e mamíferos na região cefálica e truncal (Sarkar *et al.*, 2001; Petiot *et al.*, 2002; Ido *et al.*, 2006; Ota *et al.*, 2006; Ijuin *et al.*, 2008). BMPs 2 e 4 mostraram-se capazes de favorecer a diferenciação das células da CN para neurônios simpáticos (Shah *et al.*, 1996; Shah *et al.*, 1997) e a neurogulina e os ligantes de Notch para células gliais (Morrison *et al.*, 2000; Ijuin *et al.*, 2008). A endotelina 3 estimula a diferenciação de melanócitos e, ainda é capaz de estimular a proliferação do progenitor bi-potente de glia e melanócito (Lahav *et al.*, 1996; Lahav *et al.*, 1998; Trentin *et al.*, 2004). Recentemente foi demonstrado que a sobrevivência e a proliferação do progenitor multipotente de CN, capaz de originar células gliais, neurônio, melanócitos, células musculares lisas e condrócitos, pode ser estimulado *in vitro* por Shh (Calloni, *et al.*, 2007).

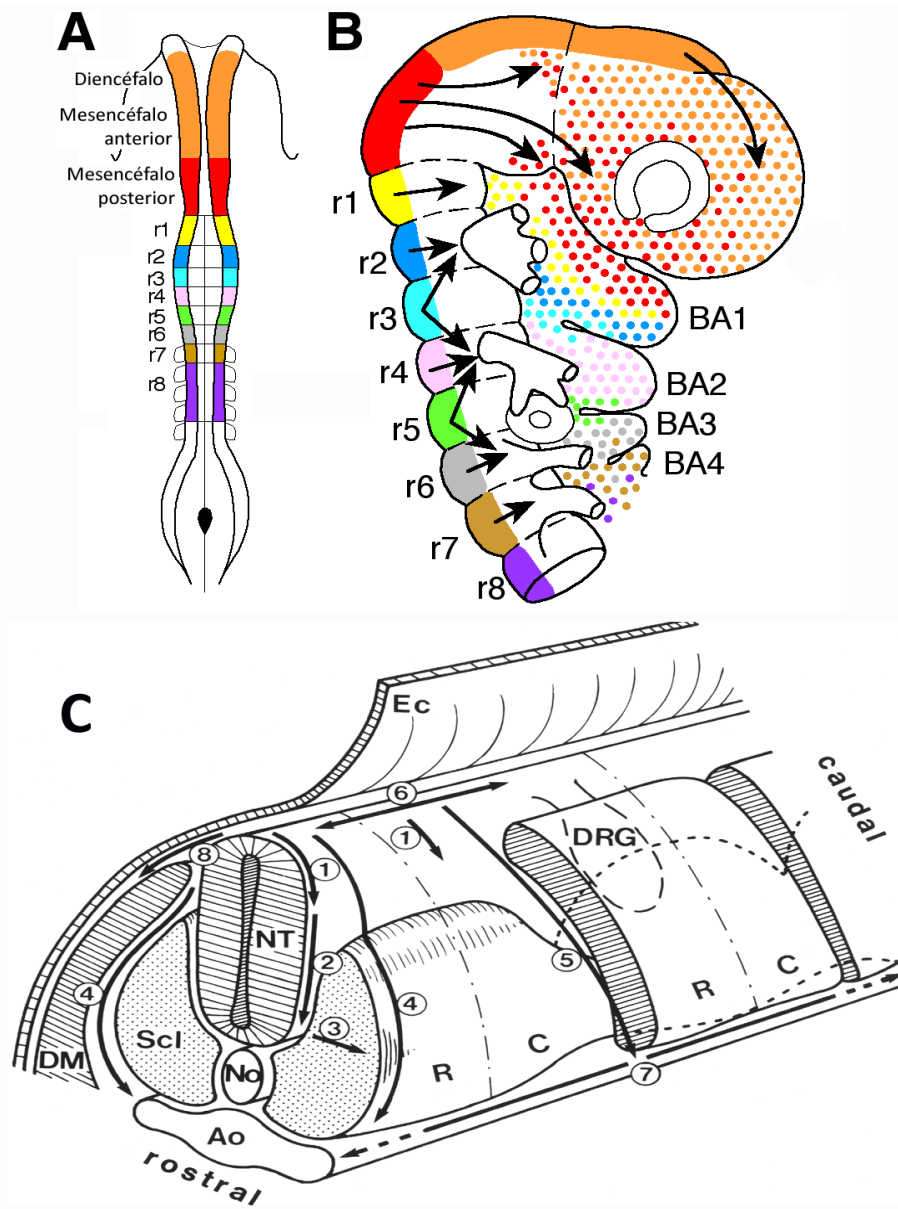


Figura 03. Migração da CN cefálica e trunca. **A.** Esquema representativo de um embrião de 5ss. As cores representam as regiões do tubo neural nessa fase de onde migrarão as células da CN. **B.** Esquema representando as rotas de migração das células da CN na região cefálica. As diferentes cores fazem referência ao ponto de origem dessas células, as setas representam as rotas migratórias, as bolinhas coloridas representam a colonização dos diferentes regiões pelas células da CN. **C.** Representação esquemática de um segmento da região trunca durante a migração das células da CN. As setas indicam as diferentes rotas de migração das células da CN numeradas de 1 a 8. Sendo as principais as rotas a dorso-lateral (8), a dorso-ventral (2) e a ventro-lateral (4). As demais rotas são basicamente derivadas destas três principais. Ec. Ectoderme; DM. Dermomiótomo; Scl. Esclerótomo; NT. Tubo neural; No. Notocorda; Ao. Aorta dorsal; DRG. Gânglios de raiz dorsais; R. Rostral; C. Caudal. Modificado de Creuzet, *et al.*, 2002 e Teillet *et al.*, 1987.

1.2.1- Migração da CN cefálica

Ao longo do eixo ântero-posterior, a CN pode ser dividida em várias regiões, CN cranial, cardíaca, truncal, caudal. Todavia, neste trabalho a CN será subdividida em apenas duas partes: CN cefálica que migra a partir das bordas neurais do diencéfalo até o sétimo somito (seguindo a ordem de formação destes); CN truncal que compreende todo o restante da CN.

Os principais derivados da CN cefálica são: todo esqueleto facial e hipobraquial, todas as células gliais e uma parte dos neurônios dos gânglios cervicais, grande parte da musculatura lisa dos vasos da cabeça, pescoço e coração, células do parênquima tímico, todas as células pigmentares, com exceção das células pigmentares da retina, células que formarão os dentes (Tab. 01). Na região cefálica, especialmente nas áreas do telencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo, a migração das células da CN é basicamente sub-ectodermal. As células da CN mesencefálica migram rostralmente sobre o primórdio óptico em direção ao processo nasal e lateralmente, colonizando a região maxilar e mandibular. A migração a partir do rombencéfalo enfrenta diversas barreiras físicas, migrando no sentido dos arcos branquiais (BA) (Fig. 03, B) (LeDouarin & Kalcheim, 1999).

Na área correspondente aos 5 primeiros somitos (também chamada de CN vagal) várias rotas de migração são espaço-temporalmente definidas: uma rota lateral que colonizará o 4 e o 5 arcos branquiais (BA4 e BA5); uma rota lateral, ao longo do arco aórtico que colonizará o coração e os grandes vasos associados; uma rota de migração ventromedial que colonizará o intestino anterior formando o sistema nervoso entérico; uma pequena rota ventral que colonizarão os gânglios cervicais; e finalmente uma rota dorsolateral que formarão os melanócitos (Fig. 03, B) (LeDouarin & Kalcheim, 1999).

Do ponto de vista molecular, a CN cefálica pode ser dividida em dois domínios: CN facial e esqueletogênica (CNFE) que inicia na altura do diencéfalo anterior e segue até a altura do segundo rombômero (subdivisões do rombencéfalo - r2), região esta onde as células da CN não expressam genes *Hox* (fator de transcrição homólogo dos genes HOM-C de *Drosophila*); CN rombencefálica posterior, corresponde do r4 até r8, região onde 4 parálogos dos genes *Hox* são expressos (Hunt et

al., 1991; Prince & Lumsden, 1994; Grapin-Botton *et al.*, 1995; Couly, *et al.*, 1996). A maioria do esqueleto da cabeça é formado por células da CN que não expressam genes *Hox* – CNFE. Já a cartilagem hióide, na sua maior parte é formada por células da CN que expressam genes *Hox* (Fig. 04). Interessantemente, a CN adjacente ao r3 apresenta células que expressam genes *Hox* e outras que não expressam. Sendo que as células que não expressam genes *Hox* migram no sentido anterior e as demais no sentido posterior (Fig. 04).

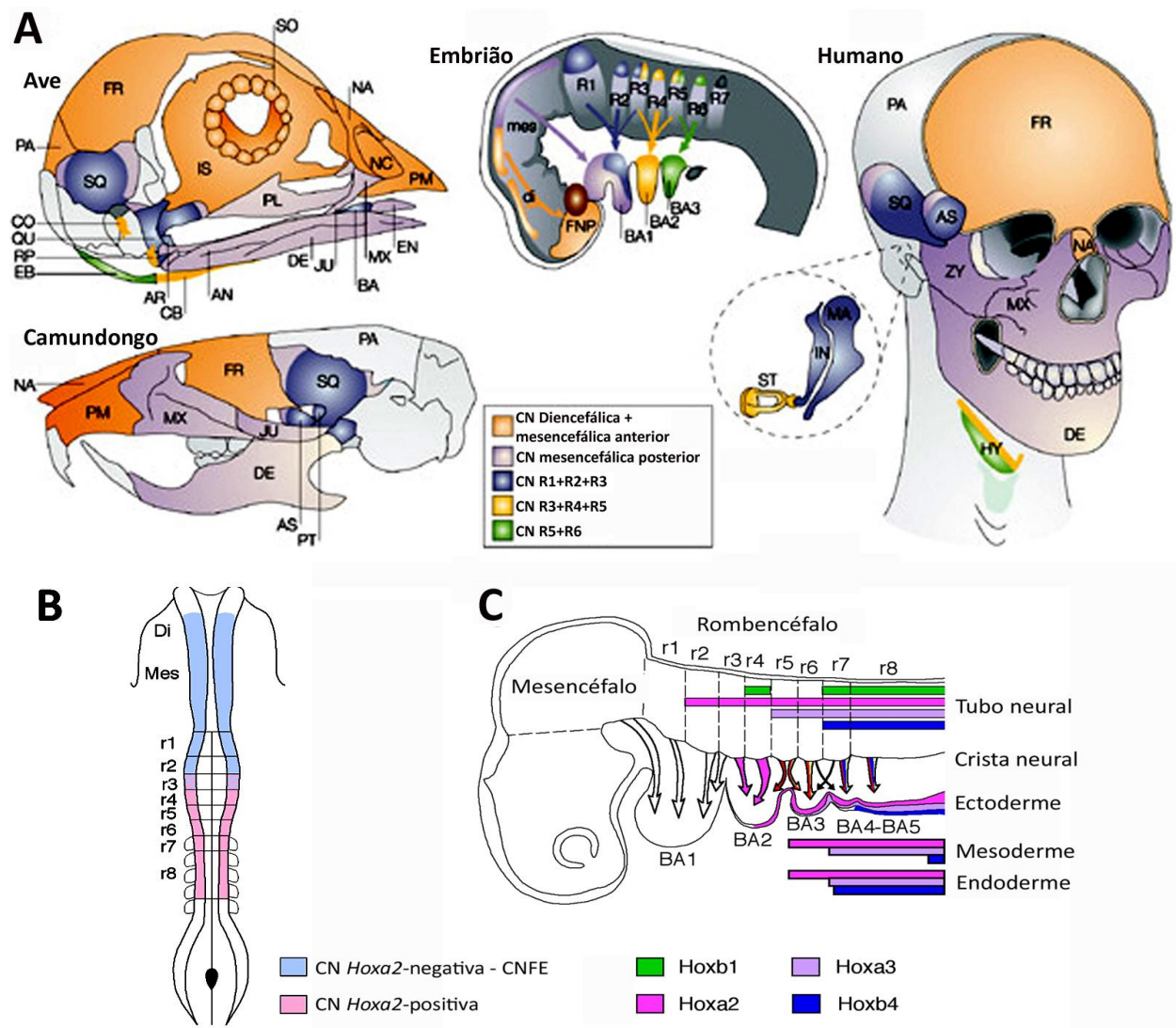


Figura 04. Formação dos ossos crânio faciais e a expressão dos genes *Hox*. Representação das vias de migração das células da CN cefálica, conforme a posição de origem das células, as cores são diferenciadas (centro). **A.** Imagens dos crânios de aves, camundongo e mamíferos estão coloridas conforme a origem das células da CN que formaram aquela estrutura (conforme esquema no centro). As células que formam a maior parte dos ossos do crânio têm sua origem na CN em todas as classes mostradas. É interessante ressaltar que

praticamente todos os ossos do crânio que são originários da CN, formam-se a partir de células da CN anterior até r2/r3 (CNFE). Interessantemente, essa CN que migra do diencéfalo até r3 não expressa genes *Hox* (**B**). É possível perceber que toda região anterior do embrião que formará toda região crânio-facial não expressa quaisquer genes *Hox* (**C**). Modificado a partir de Santagati & Rijli, 2003 e Creuzet *et al.*, 2002.

1.2.2- Migração da CN truncal

Na região truncal existem duas principais direções de migração da CN, das quais podem derivar outras: **1)** rota ventral, as células da CN migram entre o tubo neural e os somitos, dando origem aos gânglios sensoriais e simpáticos, às células de Schwann e às células cromafins; **2)** uma rota lateral que é seguida pelos progenitores dos melanócitos (LeDouarin & Teillet, 1974). A partir dessas duas principais rotas, outras podem ser definidas (Fig. 03, C)

Vários estudos tem relacionado a dinâmica de migração das células da CN ao processo de formação dos somitos (Teillet *et al.*, 1987). O processo de migração seqüencial das células da CN truncal (CNT) segue a dinâmica de formação dos somitos, sendo influenciada pela sinalização, Notch, Wnt e gradientes de ácido retinóico (Osório *et al.*, 2009; Schmidt *et al.*, 2008; Vilhais-Neto *et al.*, 2008). A migração da CNT é diretamente influenciada pelo microambiente somítico. De maneira geral, a migração das células da CN ocorre exclusivamente na metade anterior de cada somito. Isso acontece devido à expressão de efrinas na porção posterior dos somitos (O'Leary & Wilkinson, 1999).

O arranjo particular dos somitos servirá também como nicho para o desenvolvimento dos gânglios de raiz dorsal. É na região entre o esclerótomo e o dermomiótomo (sub-divisões do somito) que os progenitores de neurônios e células gliais formarão o futuro gânglio de raiz dorsal (Teillet *et al.*, 1987).

1.3- Origem evolutiva da CN

A determinação e a delaminação da CN são induzidas pelas mesmas moléculas responsáveis pelo processo de indução neural (Fig. 02). Considerando que a CN é, de certa maneira, uma consequência do processo de indução neural e que este se apresenta bastante semelhante em invertebrados e vertebrados, seria possível pensar na existência de um precursor da CN antecessor aos craniatas (Fig. 05) presente nos invertebrados?

Os invertebrados, de maneira geral, têm seu plano corporal organizado ao longo de um cordão nervoso ventral, já os vertebrados são organizados ao longo de um cordão nervoso dorsal e a notocorda. Apesar dessas diferenças anatômicas, o estabelecimento do padrão dorso-ventral e o mecanismo para o estabelecimento do cordão nervoso, seja ventral ou dorsal, são basicamente os mesmos. O gene *Sog*, por exemplo, é um determinante do padrão ventral em *Drosophila*. Esse gene é semelhante em estrutura e função ao gene *Chordin* que participa da especificação dorsal em anfíbios, aves e mamíferos. Mais interessante ainda é que o RNAm de *Sog* é capaz de promover dorsalização em *Xenopus* e o RNAm de *Chordin* é capaz de promover ventralização em *Drosophila*. Os BMPs, junto com seus antagonistas Chordin, Noggin, Gremlin participam no estabelecimento da polaridade dorso-ventral da ectoderme neural dos vertebrados. A proteína Decapentaplegic, um homólogo de BMP realiza um papel equivalente em *Drosophila*. Esses, e outros dados provem evidências de mecanismos genéticos muito bem conservados no estabelecimento do sistema nervoso de vertebrados e invertebrados. Considerando esses dados, poderia ser levantada a hipótese: a sinalização molecular necessária para o estabelecimento do sistema nervoso estaria presente em um antecessor comum a vertebrados e invertebrados (Hall *et al.*, 1998).

Yu e colaboradores (2002) encontraram um grupo de células na placa neural anterior do anfioxo, um cefalocordado que expressa um homólogo do FoxD3 – um dos genes especificadores da CN em vertebrados; chamado *AmphiFoxD3*. Todavia essa expressão não ocorre nas bordas da placa neural, como no caso do FoxD3 de vertebrados. *AmphiFoxD3* também é expresso na mesoderme axial e paraxial. Yu e colaboradores (2002) especulam que as células *AmphiFoxD3* positivas presentes

na placa neural poderiam ser ancestrais da CN. Essas células teriam mantido sua potencialidade mesenquimal determinada por *AmphiFoxD3* e seu potencial neurogênico, determinado pela sua origem embrionária – a ectoderme.

Em ascídias (urocordados) (Fig. 05), Jeffery e colaboradores (2004) mostraram que existem células com semelhanças às células da CN. Essas células migram a partir do tubo neural, expressam marcadores de CN, como *HNK1* e *Zic1* e se diferenciam em células pigmentares. Estudos recentes mostraram que essas células *HNK1* positivas são originárias do pólo vegetal anterior, mais especificamente do blastômero A7.6 do embrião no estágio de mórula. A linhagem derivada desse blastômero expressa genes descritos como especificadores da CN como, *Snail*, *Id*, *FoxD3*, bem como também alguns genes considerados determinantes da CN, como *cadherin2*, *rhoA/B/C* e *Colágeno 2* (Jeffery, *et al.*, 2008). Essas características levaram alguns autores a lançar a hipótese de que os precursores de células pigmentares poderiam ser os precursores primitivos da CN. Todavia, essa hipótese deve ser vista com um pouco de cuidado, pois larvas de equinodermos também apresentam células pigmentares migratórias, porém de origem mesenquimal (Gibson *et al.*, 1985). Os genes regulatórios da CN em vertebrados apresentam outras funções conforme o tipo celular., Algumas linhagens mesenquimais de ascídia expressam *Twist* e, outro grupo de células comprometidas com a endoderme expressam *FoxD3* (Jeffery, *et al.*, 2008).

Em relação à evolução dos derivados esqueléticos da CN, a idéia corrente envolve a preexistência das redes de genes regulatórios da esqueletogênese em células da endoderme e mesoderme faringeal (Rychel *et al.*, 2006; Rychel & Swalla, 2007). Todavia os genes tidos como especificadores de cartilagem (*SoxE*, *Sox9*, *Col2a*) não apresentam sua expressão restrita aos elementos esqueléticos em vertebrados. *Col2a* é co-expresso com *Sox9/10* nas células da CN pré-migratórias e migratórias e nos derivados esquelotogênicos dessa. Além disso, esses genes são expressos em múltiplos derivados neurais da CN, incluindo os gânglios sensoriais craniais e dorsais (Suzuki *et al.*, 2006). Em anfioxo, o *SoxE* é co-expresso com uma forma fibrilar de colágeno *colA* durante todo processo de desenvolvimento do tubo neural. Esses dados são consistentes com a

idéia da existência de uma antiga rede de regulação gênica entre esses genes nas células neuroepiteliais (Meulemanns & Bronner-Fraser, 2007). Interessantemente, todos os 6 tipos de colágenos expressos em cnidários (*Hydra*) são exclusivamente expressos na ectoderme (Zhang, *et al.*, 2007). De maneira especulativa pode ser considerado que essa rede gênica de controle da esquelotogênese poderia controlar a expressão de colágenos fibrilares na ectoderme dos primeiros metazoários. A formação de uma rede gênica, que habilita a formação da cartilagem celular dos vertebrados, tem envolvimento direto com a CN e uma posterior participação da mesoderme. O endoesqueleto mais primitivo em vertebrados é o esqueleto faringeal (Donoghue *et al.*, 2006). A cartilagem faringeal acelular dos hemicordados e do anfioxo é derivada da endoderme, em vertebrados essa cartilagem foi substituída pela cartilagem derivada da CN. Esse é um forte indicativo da coexistência de uma rede gênica de controle da esquelotogênese na endoderme e ectoderme. Essa rede, inicialmente mais funcional na endoderme, passaria para ectoderme finalizando na CN (Baker, 2008).

Além disso, a formação dos dentes ocorre basicamente pela interação entre células mesenquimais, em grande parte de origem da CN e o epitélio oral. A dentina e o esmalte foram os primeiros componentes esqueléticos mineralizados envolvendo vertebrados, aparecendo pela primeira vez em conodontes (Fig. 05). Odontoblastos derivados da CN secretam dentina e estendem finos processos. A dentina forma uma estrutura sensível a alterações mecânicas, térmicas e osmóticas: acredita-se que alterações no fluxo de fluido nos túbulos da dentina estimulariam os odontoblastos, possivelmente por deformação nos seus cílios primários (Magloire, *et al.*, 2004). Foi proposto, há décadas atrás, que os odontoblastos foram originalmente receptores sensoriais, respondendo a alterações químicas e térmicas do ambiente. Esses processos eram protegidos por MEC e eventualmente poderiam ser mineralizados. Estudos recentes sugerem que os odontoblastos de mamíferos expressam uma série de receptores neuronais tais como: receptor de capsaicina, canais de sódio, receptores sensíveis a tetrodotoxina. Em cultura células, os odontoblastos, mostraram-se capazes de gerar potenciais de ação. Sugere-se que essas células seriam as

responsáveis pelo início da transmissão no processo de dor no dente (Allard *et al.*, 2006). As aves perderam os dentes há mais de 100 milhões de anos atrás, todavia experimentos mostraram que a sinalização necessária para a formação dos dentes, ainda é bem conservada no epitélio oral das aves. Possivelmente alterações no mesênquima teriam sido os responsáveis pela perda dos dentes nesse grupo. Experimentalmente já foi demonstrado que o mesênquima oral de camundongo quando implantados em aves, permite o desenvolvimento de uma estrutura semelhante a um dente de camundongo com a formação da dentina e do esmalte (Cai *et al.*, 2009).

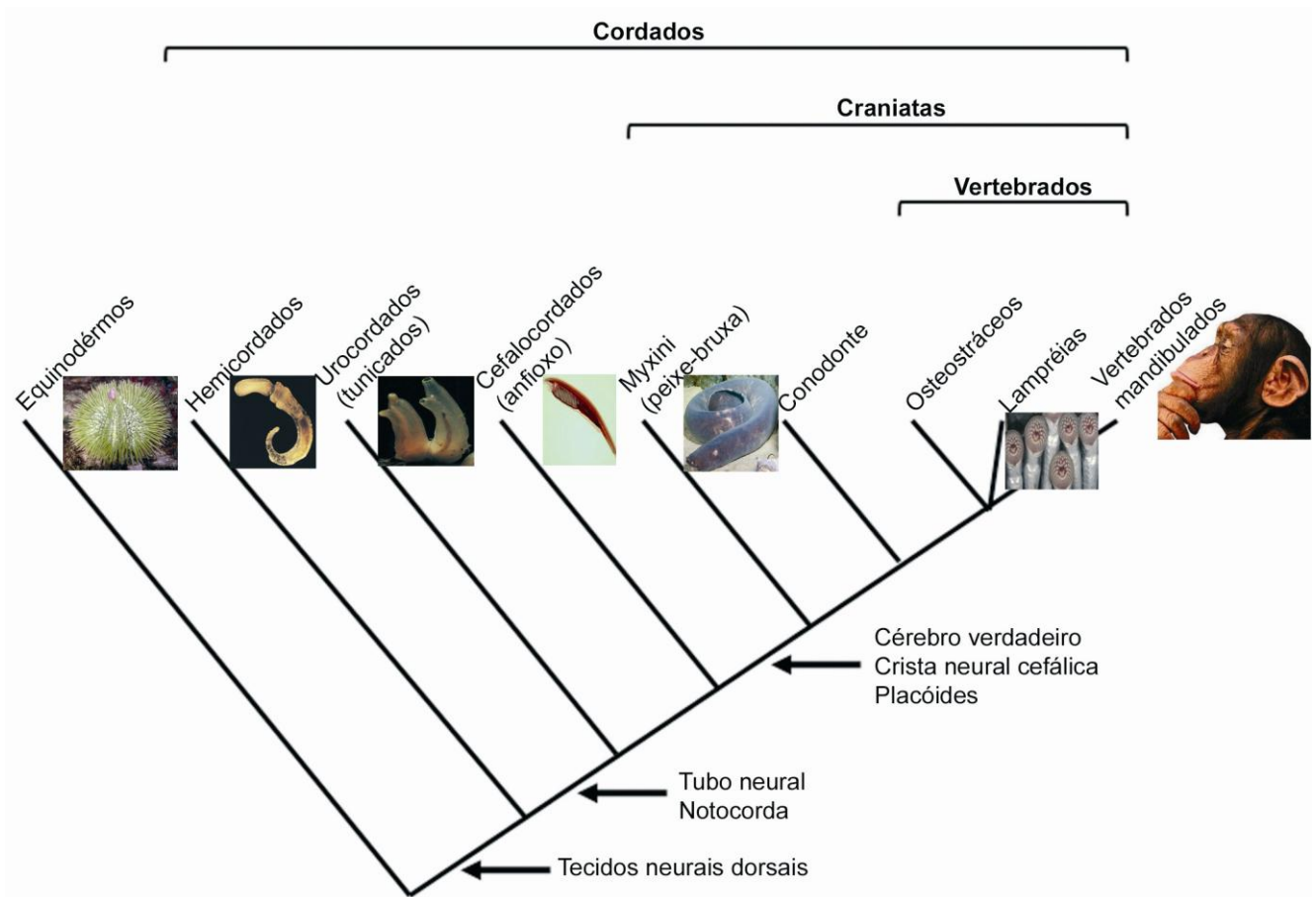


Figura 05. Árvore filogenética e características associadas ao surgimento das estruturas craniofaciais. A CN cefálica é uma característica que surge exclusivamente nos vertebrados, no entanto cefalocordados e urocordados já apresentam tubo neural e notocorda. Essa característica poderia sustentar a hipótese da existência de células precursoras da CN em grupos anteriores a vertebrados. Modificada de Holland & Graham (1995).

1.4- A crista neural e o complexo craniofacial

A história evolutiva da CN e a natureza dos primeiros craniatas estão intimamente ligadas à evolução da musculatura da faringe, cérebro, crânio e aparato sensorial da cabeça dos craniatas. Em 1983 Carl Gand e Glen Northcutt elaboraram a hipótese da “Nova-Cabeça”. Essa hipótese postula que o ancestral dos vertebrados foi um animal similar ao cefalocordado moderno, o anfioxo. Como o anfioxo, esse animal teria sido um filtrador, desprovido de musculatura faringeal, envoltório sólido para o encéfalo e estruturas anteriores típicas da cabeça de vertebrados como bulbo olfatório e vesículas telencefálicas (Gans & Northcutt, 1983). As principais inovações que viabilizaram essa transição teriam sido o desenvolvimento de elementos cartilaginosos e ósseos que permitiram a proteção do SNC, o aparecimento mais tarde de uma mandíbula, o desenvolvimento de estruturas sensoriais e plexos nervosos associados e o desenvolvimento de uma musculatura faringeal. Essas novas características permitiram ao animal passar de um estado filtrador para predador. Essas novas estruturas poderiam ter tido sua origem de duas maneiras: **a)** a partir de uma reestruturação da porção anterior do tronco ou; **b)** uma nova secção poderia ter sido adicionada ao tronco já existente. A última possibilidade, de que a cabeça seria uma neoformação, é a proposta central da teoria da “Nova-Cabeça” de Gans & Northcutt. Desse modo, Gans & Northcutt (1983) propõem que o aparecimento da CN num vertebrado ancestral, foi o ponto chave que viabilizou o aparecimento da “nova-cabeça”. A hipótese de Gans & Northcutt foi baseada na habilidade da CN de contribuir tanto para estruturas que formam a cabeça, quanto para o aprimoramento do sistema sensorial.

Os primeiros vertebrados exibindo uma “nova cabeça” foram, provavelmente, muito similares aos modernos peixes sem mandíbula (agnatos). Esses organismos que incluem a lampreia e o peixe-bruxa são similares aos vertebrados superiores no seu desenvolvimento, mas falta-lhes a mandíbula (Kuratani *et al.*, 2001). As lampreias, por exemplo, já apresentam CN (Helms *et al.*, 2005). O que estaria então limitando o desenvolvimento de toda complexidade craniofacial nesses animais? Ou o que permitiu que os vertebrados mandibulados desenvolvessem todas as estruturas craniofaciais?

A visão mais aceita é a de que o arco branquial mais rostral (BA1) teria sofrido modificação dando origem à mandíbula e maxila. Apesar das lampreias não terem mandíbula, elas apresentam lábios superiores e inferiores com morfologias distintas. Analisando marcadores moleculares expressos nos derivados mesenquimais da CN de gnatostomados, como os genes *homeobox Dlx* e *Msx*, percebe-se que os lábios da lampreia e a mandíbula dos gnatostomados apresentam um padrão semelhante de expressão desses fatores de transcrição. Todavia marcação com Dil (um traçador celular fluorescente) nas células da CN sugerem uma maior complexidade ao quadro. As células da CN que colonizam os lábios superiores e inferiores da lampreia originam-se de uma posição mais anterior no tubo neural, que as células da CN que colonizam o arco mandibular dos gnatostomados. A expressão do homólogo de *Dlx1* em lampreias é espacialmente diferente em relação aos gnatostomados, que leva a uma alteração espacial na expressão de *FGF8*, um fator de crescimento que controla além da expressão de *Dlx1*, a migração da CN e a diferenciação de várias estruturas craniofaciais (Kuratani *et al.*, 2001; Creuzet *et al.*, 2004). Se esse cenário for correto, a mandíbula dos gnatostomados é uma inovação evolutiva resultante de uma alteração topográfica em alguns pontos de interações epitélio-mesenquimais. Essas alterações resultariam num certo retardo no destino final das células da CN levando-as a entrarem em contato com outro ambiente molecular, provavelmente, permissivo a formação da mandíbula (Chai & Maxson, 2006; Mallatt, 2008).

Além das interações epitélio-mesenquimais, as interações das células da CN com a endoderme são de extrema importância na regulação do seu processo de diferenciação. Durante os estágios iniciais do desenvolvimento, a remoção cirúrgica da endoderme faringeal provoca defeitos na formação de ossos faciais e cartilagens (Couly *et al.*, 2002). Durante o desenvolvimento do primeiro arco branquial (BA1) a endoderme faringeal participará na determinação do epitélio oral, e irá produzir sinais instrutivos importantes para a diferenciação dos derivados mesenquimais da CN (Haworth *et al.*, 2004). A endoderme prospectiva do BA1, quando transplantada para a região da endoderme prospectiva do BA2, induz a duplicação da mandíbula em embriões de aves (Couly *et al.*,

2002). A remoção cirúrgica da endoderme *Shh*-positiva, em embriões de aves de 6 somitos (6ss), é capaz de impedir a expressão de *Shh* em todo BA1, impossibilitando a formação correta da mandíbula (Brito *et al.*, 2006). Por outro lado, a criação de um novo centro liberador de *Shh* numa região mais posterior é capaz de promover também a duplicação total das estruturas derivadas da mandíbula e maxila (Brito *et al.*, 2008). Esses dados mostram que a endoderme é capaz de atuar como um centro organizador da formação da mandíbula e que *Shh* seria o principal fator liberado por este organizador.

A ectoderme craniofacial tem um importante papel na regulação do destino das células da CN durante a morfogênese craniofacial, no entanto o estabelecimento inicial da ectoderme é independente das células da CN. O exemplo mais clássico da interação entre células da CN e ectoderme é o processo de formação dos dentes em mamíferos. Em camundongos, a partir do 12^o dia embrionário (E12) o epitélio dental é capaz de induzir a formação do dente quando combinado ao mesênquima derivado de CN não dental. Por outro lado, o mesênquima dental derivado de CN, também é capaz de induzir a formação de dente num epitélio não dental. Segundo os autores, a reciprocidade desse processo poderia ter sido uma vantagem adaptativa que garantiria o desenvolvimento de vários dentes em cada indivíduo (Mina & Kollar, 1987). Além disso, a ectoderme craniofacial é capaz de regular uma série de fatores de transcrição específicos de CN em determinados estágios de diferenciação. Por exemplo, o FGF8 liberado pela ectoderme dos arcos branquiais é capaz de regular a expressão de dois genes *homeobox-Lim*, *Lhx6* e *Lhx7*. Esses fatores de transcrição determinarão os limites da região oral durante o desenvolvimento da mandíbula. A ectoderme do primeiro arco branquial, através da expressão de *FGF8* e *BMP4*, é capaz de regular todo o padrão próximo-distal durante o desenvolvimento da mandíbula (Helms *et al.*, 2005).

1.5- A crista neural como centro sinalizador

A teoria sobre a formação da cabeça de Gans & Northcutt (1983) considera que a CN teria sido o grande passo evolutivo que permitiu aos craniatas desenvolverem a cabeça. Na década de

1980 quando essa teoria foi proposta, os derivados da CN já estavam bem descritos, principalmente em aves e anfíbios. No entanto, quase nada era conhecido sobre os mecanismos de sinalização que envolve a CN. Os eventos de delaminação, migração e diferenciação da CN são dependentes de informações intrínsecas e extrínsecas fornecidas pelos diversos tecidos embrionário durante o desenvolvimento (LeDouarin & Kalcheim, 1999; Hall, 1999).

Nos últimos anos a CN vem assumindo um importante e novo papel nos processos de desenvolvimento, principalmente das estruturas anteriores. Etchevers e colaboradores (1999) demonstraram que a presença da CN cefálica e de sua perfeita migração é fundamental para o desenvolvimento normal do telencéfalo. Quando a CN é totalmente removida até o rombômero 2 (r2) as vesículas telencefálicas não desenvolvem, levando à ciclopia, em alguns casos (Fig. 06, A). É importante ressaltar que o ato de remoção da CN acaba por remover parte do teto superior do tubo neural. No entanto, o fechamento do tubo neural não é prejudicado, nem tão pouco a região do prospectivo telencéfalo é atingida. Considerando que a CN não tem participação direta na formação do neuroepitélio, os autores lançam a hipótese de que a ausência de CN estaria prejudicando a vascularização e assim comprometendo o desenvolvimento do telencéfalo. Num trabalho posterior, Etchevers e colaboradores (2001) demonstram que as células da CN originam os pericítos e as células musculares lisas de todos os vasos sanguíneos da face e do prosencéfalo (Fig. 06, D e E). O desenvolvimento de um sistema de irrigação sanguínea adequado é um passo evolutivo importante para viabilizar o aumento do tamanho de um determinado órgão.

Apesar do grande impacto que tiveram os trabalhos de Etchevers, havia ainda alguns pontos sem explicação. Após a ablação da CN anterior (até r2) era possível observar alterações no desenvolvimento do prosencéfalo logo nas primeiras 24h após a microcirurgia. Nesse período as células da CN ainda não haviam diferenciado nem em pericitos, nem em músculo liso. Além disso, quando um fragmento de CN de uma região posterior a r2 era implantado na região anterior a r2, a formação dos ossos e do telencéfalo não ocorria normalmente, no entanto o sistema vascular era parcialmente recuperado.

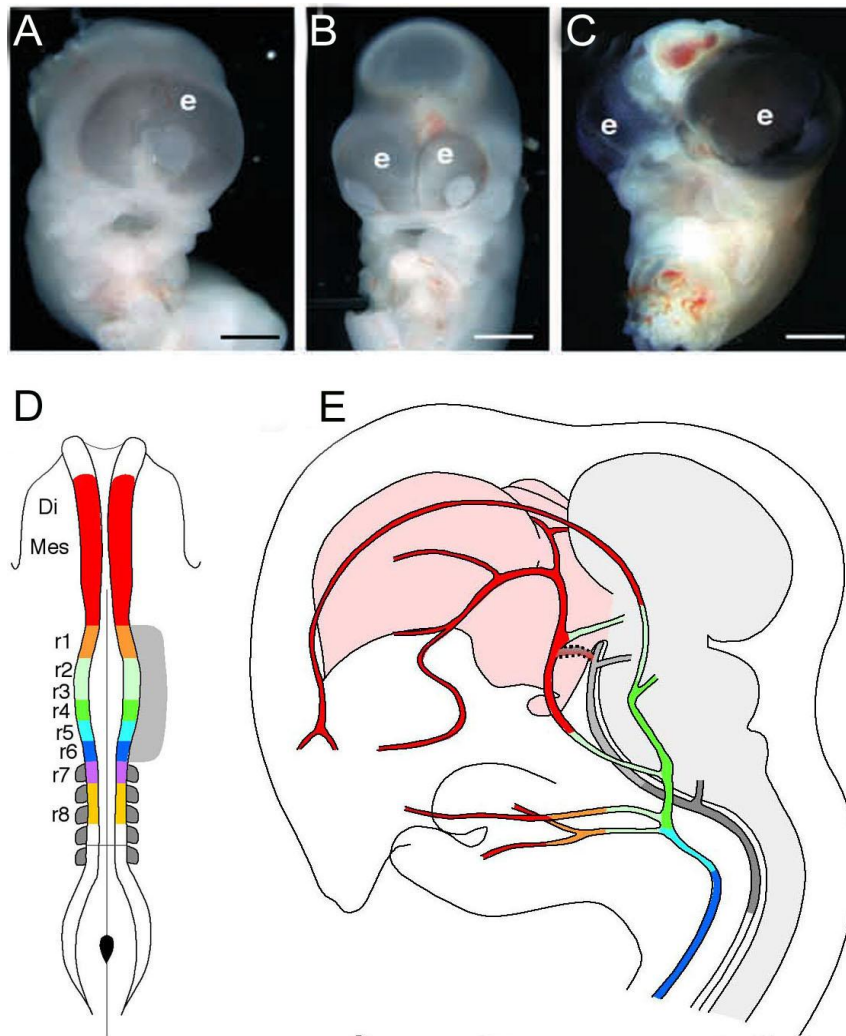


Figura 06. A ablação da CN cefálica leva a mal formação do telencéfalo. A alteração nos vasos sanguíneos na região cefálica leva a problemas de desenvolvimento crânio-faciais. **A, B, C.** Fenótipo de embriões após 6 dias da remoção total da CN cefálica. A não formação da parte anterior do SNC pode levar a ciclopia total (**A**), ou simplesmente a uma alteração no posicionamento dos olhos (**B e C**). **D** Esquema das diferentes regiões da CN cefálica, marcadas com cores distintas: a CN diencefálica/mesencefálica e a CN de cada rombômero. **E.** Ilustração representativa dos principais vasos da cabeça de embrião de ave e suas correspondências em cores quanto à origem das células da CN que participam na sua constituição celular (músculo liso e pericitos), usando como referencia o esquema **D**. Modificado de Etchevers *et al.*, 1999; Etchevers *et al.*, 2001.

O grupo de Nicole LeDouarin, na década de 1990, realizou uma série de elegantes experimentos observando que toda a CN cefálica até o nível do r2 (CN *Hox*-negativa - CNFE) é a responsável pela formação da maior parte dos ossos e cartilagens da cabeça (Fig. 04) e também pelo

desenvolvimento correto do prosencéfalo (Couly *et al.*, 2002; Creuzet *et al.*, 2002). Esses autores realizaram uma série de transplantes de CN em embriões de aves (galinha e codorna) alterando o padrão normal de expressão dos genes *Hox* (*Hoxa2*, *Hoxa3*, *Hoxb4*). Demonstraram ainda que qualquer fragmento de CN que tenha origem numa região que expressa genes *Hox* é incompatível com o desenvolvimento adequado do esqueleto facial e do prosencéfalo. Além disso, a expressão forçada de genes *Hox* no domínio *Hox*-negativo da CN, leva à perda de seu potencial esqueletogênico. Com base nesses dados pode-se sugerir que tão importante quanto o aparecimento da CN no processo evolutivo da cabeça, seria a perda da expressão dos genes *Hox* nas células da CN anterior. Helms e colaboradores (2005) apresentam um comparativo entre a expressão de genes *Hox* e o surgimento da CN em gnatostomados e agnatos (Fig. 07). Os gnatostomados apresentam expressão de genes *Hox* até o segundo arco branquial (BA2). Em agnatos, Ferrier e colaboradores (2000) e Cohn (2002) demonstraram que a expressão de genes *Hox*, no estado larval é anterior ao primeiro arco branquial. O gene *HoxL6* foi o gene do grupo *Hox* que teve sua localização mais rostral, todavia esse mesmo gene apresenta uma certa variabilidade quanto ao seu limite ântero-posterior de expressão, podendo, em raros casos, ter um padrão de expressão limitado a porção mais codal do primeiro arco branquial (Fig. 07). O limite mais anterior para a expressão de *Hox* poderia explicar porque esses animais não desenvolvem uma mandíbula, apesar de terem CN. Experimentos onde a expressão de *Hox* é forçada na CN do BA1 de embriões de aves, a formação da mandíbula é inviabilizada, os ossos mandibulares que tem sua origem na CN do primeiro arco branquial, na maioria dos casos não chegam sequer a se desenvolver (Couly *et al.* 2002). Camundongos mutantes que tiveram a expressão de *Hoxa2* bloqueada, exclusivamente no BA2, apresentaram uma duplicação das formações ósseas derivadas do BA1 (Kutejova *et al.*, 2005).

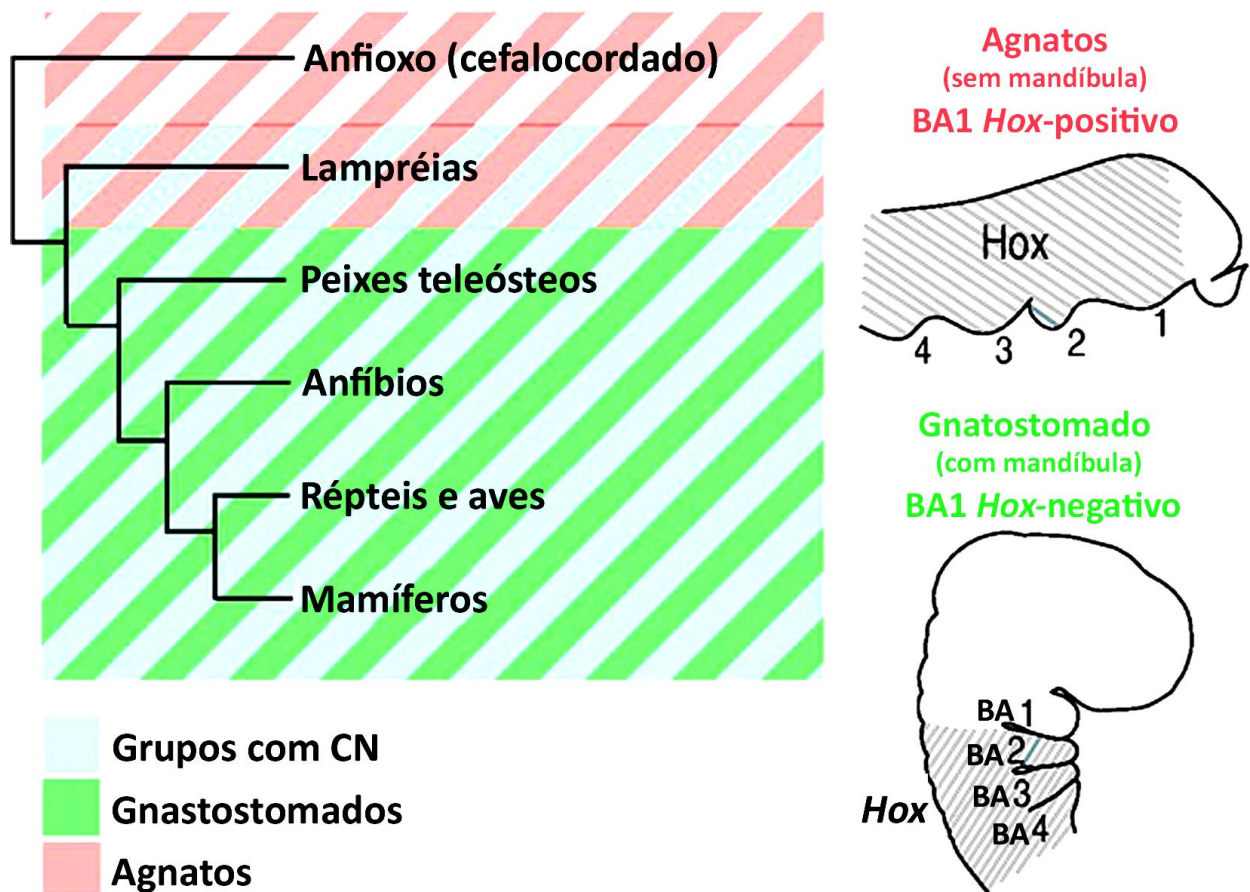


Figura 07. Representação evolutiva do surgimento da CN x formação da mandíbula. À direita, imagem representando o padrão de expressão de genes *Hox* em agnatos e gnatostomado. **BA.** Arco branquial. Modificado de Helms *et al.* 2005.

A CN que migra a partir das bordas do tubo neural no r3 apresenta uma característica bastante interessante em relação à expressão de *Hox*. São as únicas células da CN capazes de expressarem ou não genes *Hox*. Dependendo do caminho de migração que elas seguem, anterior, ou posterior, podem deixar de expressar ou manter a expressão de *Hox*, respectivamente. Essa característica particular da CN do r3 foi utilizada por Creuzet e colaboradores (2004) para elucidar alguns mecanismos moleculares envolvidos na capacidade da CN anterior de formar estruturas relacionadas à cabeça. Numa primeira série de experimentos onde a CNFE foi removida cirurgicamente, esses autores observaram uma grande redução na expressão de *FGF8* no neuroepitélio da região neural anterior (ANR) e na ectoderme dos arcos branquiais. Já é bem descrito que *FGF8* é um fator de crescimento fundamental para o desenvolvimento dos processos

maxilo-mandibulares (Crossley *et al.*, 1996; Mallat, 2008). Para verificar se realmente era a ausência de Fgf8 o grande responsável pela não formação de ossos faciais após ablação da CNFE, microesferas impregnadas Fgf8 foram colocadas em contato com a ectoderme da região cefálica, logo após a ablação da CNFE (Fig. 08). Esses autores verificaram que o fenótipo normal era quase totalmente recuperado, inclusive observando a formação de ossos mandibulares. Considerando que são as células da CN anterior que dão origem a esses ossos, e que estas haviam sido totalmente removida, de onde estariam vindo as células que estão formando essa região? Essa questão foi respondida nesse mesmo trabalho, utilizando o sistema de quimeras galinha-codorna. Os autores descrevem que após a ablação da CNFE e aplicação de Fgf8 exógeno, as células do r3 migraram e proliferam em resposta ao Fgf8. Essa migração e proliferação das células da CN de r3 foi extraordinária a ponto de colonizarem todo o BA1 e regiões peri-oculares (Fig. 08, L). Mais tarde, Creuzet e colaboradores (2006) demonstraram que não apenas a mandíbula, mas também o desenvolvimento do telencéfalo pode ser recuperado utilizando administração exógena de Fgf8 após ablação da CNFE (Fig. 08, O). Com base nesses dados, pode-se lançar a hipótese de que a CN apresenta uma função bem evidente na coordenação do processo de desenvolvimento da cabeça, não apenas por participar da constituição de muitos tecidos, mas por poder apresentar uma participação efetiva na sinalização necessária para esse processo.

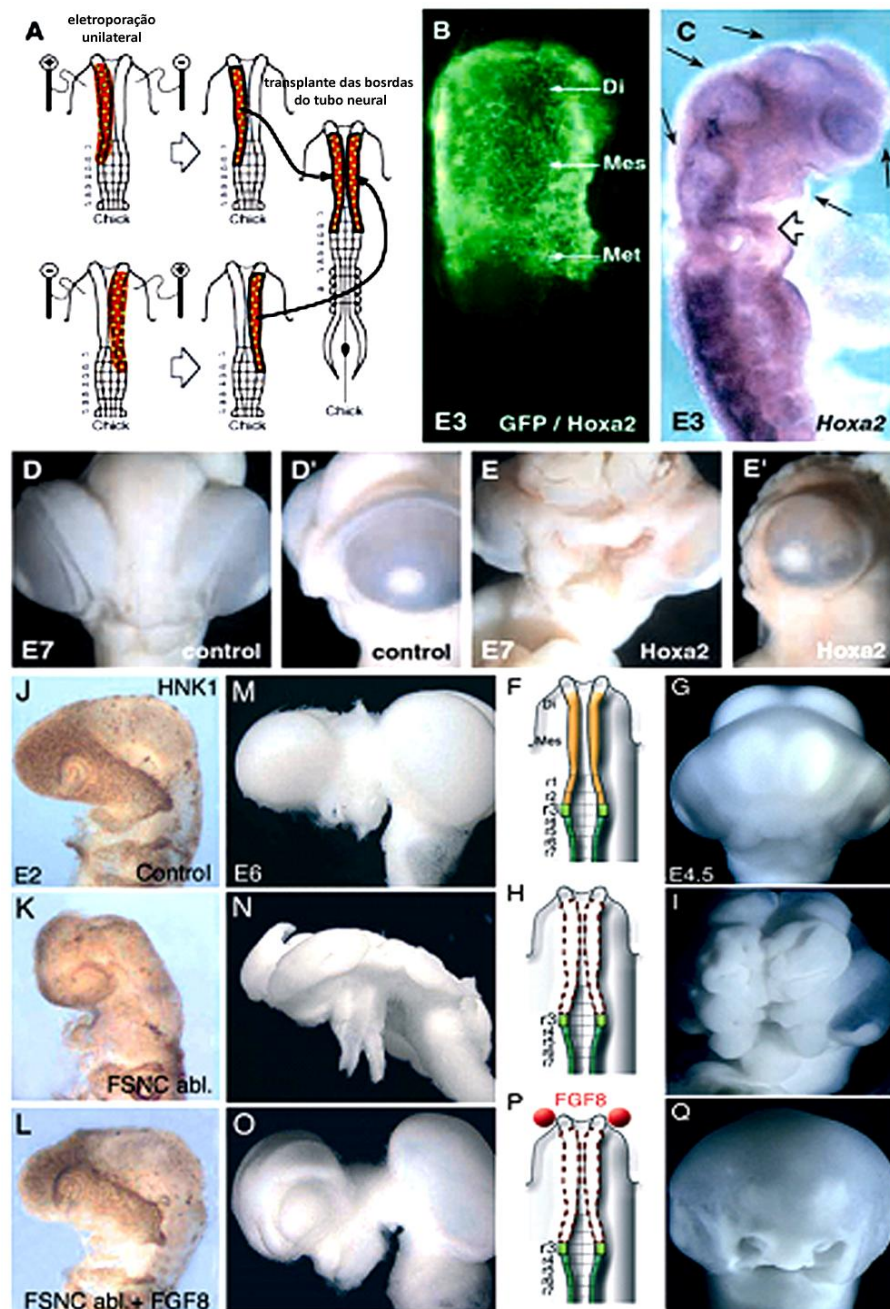


Figura 08. Expressão forçada do gene *Hoxa2* e ablação da crista neural facial e esqueletogênica (CNFE), promovem alterações no desenvolvimento de estruturas craniofaciais. **A.** Esquema representando o processo de eletroporação e a microcirurgia de transplante bilateral da CNFE, realizada em embriões de galinha com 5-6ss (aproximadamente 30h de desenvolvimento). **B.** Expressão de *Hoxa2*, conjugada a *GFP* mostrando a expressão de *Hoxa2* no domínio onde foi realizada a microcirurgia, a marcação em verde difusa e superficial representa as células da CN durante a migração. **C.** O limite posterior da expressão de *Hoxa2* é o segundo arco branquial (seta grande). A expressão ectópica na região anterior mostra o sucesso do processo de eletroporação. **D.** Embriões controle de 7 dias; **E.** Embriões de 7 dias que foram submetidos a expressão forçada de *Hoxa2* na CNFE. Tanto a formação da face, quanto da porção posterior do telencéfalo é bastante prejudicada. **J-Q.** Embriões submetidos à ablação da CNFE em 3 situações distintas. **J, M, F, G.** Embriões

controle; **K, M, H, I**. Embriões submetidos à ablação da CNFE; **L, O, P, Q**. Embriões submetidos à ablação da CNFE e com implante de microesferas liberadoras de FGF8. A ablação da CNFE leva a defeitos no desenvolvimento da cabeça (**I**) e do sistema nervoso (**N**), decorrentes da não colonização por células da CN da região cefálica (**K**), evidenciada pela imunomarcagem para HNK1 (marcador de células da CN durante a migração). O implante das microesferas promove a colonização por células da CN, vindas do r3 em toda região rostral, conseqüentemente, uma recuperação da morfologia da cabeça (**Q**) e do desenvolvimento do sistema nervoso (**O**) foi observada. **M, N, O**. Sistema nervoso dissecado de embriões de 6 dias. Modificado a partir de Creuzet *et al.* 2002 e Creuzet *et al.* 2006.

Já é bem conhecido que a expressão de *FGF8* na ANR pode ser controlada pelos níveis de BMP4 expresso pela ectoderme cefálica (Ohkubo, *et al.* 2002). Como *Noggin*, um antagonista clássico de BMPs é expresso pelas células da CN na região cefálica (Tzahor *et al.* 2003), poderia a CN da região anterior estar atuando como uma espécie de centro organizador do desenvolvimento da cabeça? Os genes *Hox*, ou melhor, dizendo, a ausência dos genes *Hox* na região anterior parece ser determinante para a formação da cabeça, mas qual é o mecanismo molecular que envolve *Hox* e formação da cabeça? É importante perceber que ao longo do processo evolutivo a perda de expressão dos genes *Hox* na região anterior permitiu o desenvolvimento da cabeça, mas quais foram às alterações moleculares que esse fenômeno provocou? Essas foram às questões cerne que guiaram o desenvolvimento desse trabalho, na busca pela compreensão, mesmo que parcial, de como ocorreu um dos maiores fenômenos do processo evolutivo dos vertebrados. O surgimento da cabeça.

Gans & Northcutt (1983) postularam que o surgimento da CN teria sido o grande passo evolutivo que viabilizara o desenvolvimento da cabeça. Vários autores demonstram que a perda de expressão dos genes *Hox*, na região anterior do embrião ao longo do processo evolutivo, teria sido determinante para o desenvolvimento da cabeça. Neste trabalho buscamos compreender as relações entre a CN cefálica, genes *Hox* e desenvolvimento de estruturas crânio-faciais. Buscar elucidar os mecanismos moleculares que permitem, a partir da perda na expressão de *Hox* nas células da CN, o desenvolvimento da cabeça.

2- JUSTIFICATIVA

O conhecimento tanto dos processos moleculares, quanto dos processos evolutivos relacionados ao desenvolvimento das estruturas cefálicas em vertebrados é uma peça fundamental para a compreensão do surgimento da cabeça nos gnastostomados. Além disso, esse conhecimento molecular é fundamental para alicerçar estudos de medicina regenerativa relacionados aos processos crânio-faciais, tais como regenerações ósseas, vasculares, dentárias, pigmentares e nervosas. As células da CN, consideradas há mais de 20 anos como a grande aquisição dos vertebrados durante o processo evolutivo, passam agora, a terem um papel primordial no futuro da medicina. A compreensão dos mecanismos morfogenéticos e moleculares envolvidos na biologia das células da Crista Neural é a primeira barreira a ser transposta. Esse conhecimento gerado terá grande impacto tanto na biologia do desenvolvimento, quanto na medicina regenerativa.

3- OBJETIVOS

3.1- Objetivo Geral

Avaliar a influência da expressão forçada dos genes Hox na diferenciação da CN cefálica nas estruturas crânio-faciais em modelo de aves. Elucidar os mecanismos moleculares que permitem, a partir da perda na expressão de Hox nas células da CN, o desenvolvimento da cabeça.

Estudar a influência de fatores microambientais na diferenciação dos derivados da CN.

3.2- Objetivos específicos

- *Analisar as principais alterações moleculares induzidas pela expressão forçada de Hoxa2 nas células da CN cefálica que inviabilizam desenvolvimento crânio-facial.* Creuzet e colaboradores (2002) demonstraram que a expressão forçada de genes Hox na CN cefálica impede o desenvolvimento da cabeça, todavia os mecanismos moleculares envolvidos nesse processo não são conhecidos.
- *Analisar o padrão normal de expressão de Six2 na região cefálica de embriões de “Gallus gallus”.* Kutejova e colaboradores (2005) observaram que na região do BA2 onde Hoxa2 é normalmente expresso, o fator de transcrição Six2 é um alvo molecular direto de Hoxa2. Sendo Six2 expresso pelas células da CNFE, esse passa a ser um forte candidato a participar dos mecanismos de controle do desenvolvimento crânio-facial.
- *Verificar as possíveis relações entre a expressão forçada de Hoxa2 na CNFE e alterações na expressão de Six2.* Sendo Hoxa2 um inibidor direto da expressão de Six2 (Kutejova et al., 2005; 2008), a expressão ectópica de Hoxa2 na CNFE poderia provocar uma redução na expressão endógena de Six2 na região cefálica.

- *Observar se o bloqueio na expressão endógena de Six2 nas células da CNFE provoca alteração no desenvolvimento crânio-facial.* Sendo conhecido que *Hoxa2* é capaz de inibir a expressão de *Six2*, o experimento de perda de função para *Six2* nas células da CNFE evidenciaria quais os efeitos da expressão forçada de *Hoxa2* na CNFE são devidos a redução na expressão de *Six2* nessas células.
- *Analisar os efeitos dos fatores de crescimento EGF e FGF2 na diferenciação das células da CNT in vitro.* EGF e FGF2 são fortes candidatos a moléculas capazes de controlar a diferenciação das células da CN, no entanto pouco é conhecido. Utilizando um sistema mais simples, como a cultura de células da CNT, fica mais fácil e claro de estudar os efeitos desses fatores sobre a diferenciação das células da CN.

4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1- Microcirurgia em embriões em estágio de nêurula

As micromanipulações cirúrgicas foram realizados em embriões de galinha (*Gallus gallus*) e codorna (*Coturnix japonica*) nos estágio de 5-6 somitos [5-6ss, relativo a 30h de incubação a 38°C; HH9 (Hamburger e Hamilton, 1951)]. Os embriões foram preparados para microcirurgia *in ovo* conforme as técnicas descritas por Teillet e colaboradores (1999). Os ovos foram incubados deitados em posição fixa. O desenvolvimento do embrião ocorre na região mais apical, na parte externa do vitelo. O mapa de destino para as células da crista neural cefálica estabelecido por Grapin-Botton e colaboradores (1995) serviu como referência para determinar os níveis presuntivos de várias estruturas cefálicas: diencéfalo anterior e posterior, mesencéfalo anterior e posterior e rombômeros 1 a 8 (r1 a r8). Os embriões em estágios-específicos foram isolados em tampão fosfato salino (PBS) estéril (Gibco). A região da borda neural correspondente exatamente a crista neural facial e esqueletogênica (CNFE – domínio *Hox negativo*; corresponde a borda neural do diencéfalo até r2) foi removida, usando micro-bisturis de vidro (preparados no próprio laboratório), e implantada *in ovo* em embriões hospedeiros que tiveram a mesma região removida previamente (Fig. 09). Em seguida os ovos hospedeiros foram selados com fita adesiva plástica não-tóxica (Niceday – França) e mantidos em incubadores a 38°C com 95% de umidade, pelo tempo necessário para cada experimento.

4.2- Expressão ectópica de *Hoxa2* na CNFE

A indução ectópica da expressão do gene *Hoxa2* na CNFE foi obtida conforme descrito por Creuzet e colaboradores (2002). Uma construção gênica feita a partir de um vetor retoviral *Hoxa2*-RCAS (Grammatopoulos *et al.*, 2000) foi misturada a uma solução de *Fast Green* (0,01% - Sigma) e injetada na luz do tubo neural na região anterior. A eletroporação bilateral foi realizada a partir do posicionamento preciso de dois ânodos sobre a membrana vitelínica de maneira a flanquear a região

cefálica do embrião. Um cátodo foi posicionado pouco à frente da região mais anterior do embrião, conforme esquema na figura (Fig. 09). O plasmídeo *Hoxa2*-RCAS foi eletroporado nas células da CN por uma série de 5 pulsos de 27V e 50mA (Eletroporador BTX T830, Genetronics, San Diego, CA). Imediatamente após a eletroporação, a borda neural correspondente a CNFE foi cirurgicamente removida e re-implantada em embrião hospedeiro no mesmo estágio de desenvolvimento onde a CNFE havia sido previamente removida (Fig. 09).

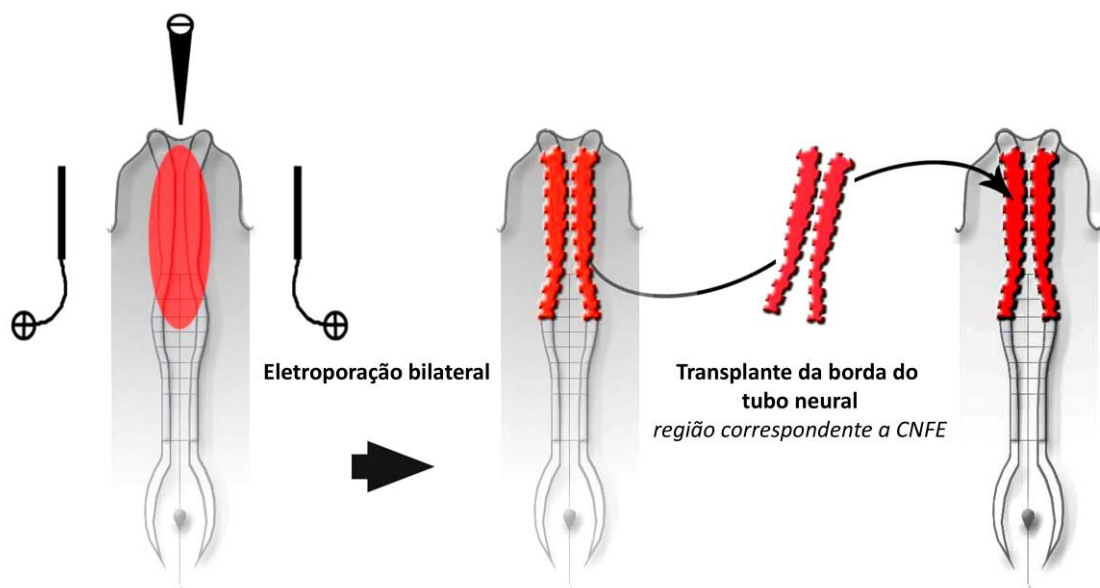


Figura 09. Representação esquemática do processo de eletroporação bilateral nas bordas do neuroepitélio e, subsequente transplante somente da CNFE para um embrião previamente preparado. Embrião de 5-6ss.

4.3- Bloqueio da expressão de *Six2* utilizando *Six2*-dsRNA

O bloqueio da expressão de *Six2* *in vivo*, nas células da CN, foi obtido a partir da eletroporação de uma sequência de RNA dupla fita de 300pb homologa a uma região do RNAm para *Six2*, conforme descrito por Pekarik e colaboradores (2003) e Creuzet e colaboradores (2004). Para obter esse RNA-dupla fita, primeiramente foi realizada a amplificação por PCR (reação em cadeia da polimerase – Promega, Master Mix) de uma região específica para *Six2*, não homologa a outras proteínas. Essa amplificação foi realizada a partir do cDNA de embrião de 20ss de galinha previamente sintetizado, conforme recomendações do fabricante (TriZol, Invitrogen). O produto do

PCR obtido foi clonada num vetor de transcrição de duplo sentido pCR®II-TOPO® (Invitrogen). A síntese do RNA nos sentidos sense e antisense foram realizadas separadamente, utilizando as RNAs polimerases T7 e SP6 (Promega), respectivamente. Em seguida, os RNAs de fita simples obtidos foram purificados (Illustra™ Kit RNA purification – GE Healthcare) e misturados em concentrações eqüimolares, aquecidos a 95°C por 5min e resfriados lentamente a temperatura ambiente (0,5°C x min⁻¹) (Termociclador Eppendorff) para que ocorresse o alinhamento dos RNAs sense e antisense de maneira específica formando RNAs de fita-dupla lineares. Um tratamento com RNase I (Roche) foi realizado durante 30min para que as extremidades não linearizadas e eventuais seqüências não linearizadas fossem degradadas. O produto obtido foi um RNA em dupla fita linear (dsRNA) homólogo a uma seqüência do mRNA para *Six2* (ds*Six2*). RNAs sense e antisense para *Six2* (fita simples) foram utilizados como controles do experimento. Além disso, dsRNA para *Hoxa2* foi sintetizado e utilizado como controle negativo (*Hoxa2* não é expresso na CNFE).

Uma solução de 1µg/µl de dsRNA-*Six2* foi preparada em PBS e misturada a *Fast Green* (0,01% - Sigma). Em seguida, essa solução foi injetada na luz do tubo neural na região cefálica. O dsRNA-*Six2* foi bilateralmente eletroporado com descrito no tópico anterior. Da mesma maneira como foi feito com a supre-expressão de *Hoxa2*, as bordas neurais correspondentes a CNFE foram removidas cirurgicamente após a eletroporação e re-implantadas em embriões previamente preparados (Fig. 09). Dessa maneira, os efeitos de inibição da expressão de *Six2* foram restritos somente à CNFE.

4.4- Análises de expressão *in vitro* por RT-PCR

O perfil molecular das células da CNFE após a eletroporação com *Hoxa2*-RCAS ou ds-*Six2*, foi analisado também *in vitro*. Esse tipo de experimento permite uma análise das influências de *Hoxa2* e *Six2* sobre as células da CNFE isoladamente.

Após a eletroporação bilateral para *Hoxa2*-RCAS ou ds-*Six2* as bordas neurais correspondentes a CNFE foram removidas cirurgicamente e imediatamente colocadas em cultura por 24h em DMEM (Gibco) com 10% de SFB (soro fetal bovino - Gibco) em incubadora a 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade relativa (Nuair). Nesse período as células da crista neural migram a partir do fragmento do tubo neural, fixando-se a superfície do recipiente de cultura. Uma vez removido o explante do tubo neural, as células da CN foram descoladas com solução de tripsina/EDTA (0,25%/0,02%) e imediatamente processadas para a preparação de cDNA (Kit SuperScriptTMIII – Invitrogen), conforme orientações do fabricante.

Os padrões de expressão de *Hoxa2*, *Six2*, *Noggin*, *DAN*, *Cerberus* e *GAPDH* foram determinados por PCR (MasterMix Promega) utilizando *primers* (Invitrogen) específicos (tabela 02). As análises de expressão *in vitro* foram realizadas nos seguintes grupos: **1)** células da CNFE normal (CN *Hoxa2* negativa); **2)** células da CN isoladas entre r4 e r7 (CN *Hoxa2* positiva); **3)** células da CNFE transfectadas com *Hoxa2*-RCAS; **4)** células da CNFE transfectadas para ds-*Six2*.

Tab. 02- *Primers* utilizados para amplificação por RT-PCR

Gene	Produto (pb)	Temperatura anelamento	Sequência (5'- 3')	
<i>Cerberus</i>	571	60°C	Sense	- ttggagacacagagccacag
			Antisense	- ggaccaggaacatgaaagga
<i>DAN</i>	453	60°C	Sense	- aggagaacatgcccgcagag
			Antisense	- atcctgcagacagcccttgg
<i>Hoxa2</i>	221	60°C	Sense	- aaatttaagggtcggagga
			Antisense	- tgggtgactggtgttgaaaa
<i>GAPDH</i>	345	60°C	Sense	- ggactgtcaaggctgagaa
			Antisense	- aagaccctccacaatgcca
<i>Noggin</i>	672	60°C	Sense	- ttctgcccgtctatacac
			Antisense	- gatgatgggtactggatgg
<i>Six2</i>	279	65°C	Sense	- gcgatcaatgaacgggaataa
			Antisense	- agcggtttaagagcccagat

4.5- Imuno-histoquímica em embriões inteiros

Uma série de embriões que tiveram a CNFE eletroporada para *Hoxa2*⁺-RCAS ou ds-*Six2* foram analisados quanto ao padrão de migração das células da CN e o padrão geral de proliferação celular.

O epítipo HNK-1 foi utilizado como marcador de células da CN em migração (Bronner-Fraser, 1986) e a histona H3 no seu estado fosforilada (phH3) foi utilizada como indicativo de atividade proliferativa das células. Anticorpos específicos contra HNK1 (Developmental Studies Hybridoma Bank) e PhH3 (Sigma) foram dissolvidos em PBS-T (PBS com 0,5% de Triton) a 1:5 e 1:75, respectivamente. Embriões pré-fixados com formaldeído a 4% (Sigma) em PBS foram mantidos na solução com o anticorpo por 24h a 4°C sob agitação. Após 12hs de lavagens em PBS-T com trocas do tampão a cada 30min, os embriões foram incubados com anticorpos secundários específicos na

diluição de 1:100 (anti-IgM-TexasRed e anti-IgG-FITC, respectivamente – ambos Southern Biotechnology) por 24h a 4°C sob agitação leve. Após um período de 48hs de lavagens em PBT, ao abrigo da luz, os embriões foram observados e fotografados em microscópio estereoscópio de epifluorescência (MZFL III-Leica) (Creuzet *et al.*, 2002).

4.6- Hibridização *in toto*

Os embriões destinados a hibridização *in situ* foram dissecados, todas as membranas embrionárias removidas e fixados por 18h em formaldeído 4% em PBS. Em seguida os mesmos foram desidratados em séries de metanol/PBS (25%; 50%; 75%; 100% de metanol - Merck) e armazenados a -20°C em metanol absoluto. Após re-hidratação numa série de metanol/PBS (75%; 50%; 25%; PBS puro), os embriões foram permeabilizados com proteinase K (Roche) 20µg/mL em PBS, pós-fixados com formaldeído 4% + glutaraldeído 0,1% (Sigma) em PBS por 30min. Os embriões foram incubados em tampão de hibridização (formamida 50% - Merck; EDTA 5mM - Sigma; RNA de levedura 50µg/mL - Roche; Tween20 0,2% - Sigma; CHAPS 0,5% - Sigma; heparina 100µg/mL - Sigma; tampão SSC 1,3X - Invitrogen) por 30min a temperatura ambiente, seguido de uma pré-hibridização em mesmo tampão a 70°C por 2h. A hibridização foi realizada durante 24h a 72h (conforme a idade do embrião) em tampão de hibridização, acrescido de 500ng/mL da sonda de interesse, previamente preparadas e marcadas com digoxigenina (Dig) (Kit Sonda – Promega) conforme descrito em Creuzet e colaboradores (2002). Depois desse período várias lavagens em tampão de hibridização, seguido por tampão MAB foram realizadas. Numa segunda etapa foi realizado a imunomarcação com anti-Dig conjugado a fosfatase alcalina (Roche) por 18h. Novas lavagens foram realizadas em tampão MAB e a revelação foi realizada usando kit (BCIP/NBT – Zymed), conforme recomendações do fabricante. Alguns embriões foram incluídos em parafina e seccionados para análises microscópicas.

4.7- Coloração para cartilagem em embrião inteiro

Estruturas cartilaginosas de embriões de 7,5 dias (E7,5) foram visualizadas após fixação dos embriões com 80% de etanol (Merck), 20% de ácido acético (Merck) e 0,015% de Alcian Blue 8GX

(Sigma) por 16h. Após extensivas lavagens em etanol 100%. O tecido foi clarificado com solução de 1%KOH (Sigma) e 20% de glicerol (Merck) em água.

4.8- Cultura de células de crista neural de codornas

As culturas primárias de células da CN foram realizadas como descrito previamente por Dupin e colaboradores (1998) e Trentin e colaboradores (2004), com algumas modificações. Segmentos de tubos neurais da região truncal de embriões de codornas nos estágios 18-25 somitos (18-25ss) foram dissecados na presença de solução de pancreatina (6mg/mL) e mantidos por 24h em placas de cultura em meio α -MEM (Gibco-BRL) com suplementação de 2% de extrato de embrião de frango (EE), 10% de soro fetal bovino (SFB). Depois desse período, o tubo neural foi removido e as células descoladas na presença de solução de tripsina (0,25%) e EDTA (0,02%) em tampão fosfato salino (PBS), pH 7,4 e re-plaqueadas numa densidade de 1200 células/cm² em meio complexo, composto de α -MEM, 10% de SFB, 2% de EE, Hidrocortisona (0,1 μ g/mL - Sigma), Transferrina (10 μ g/mL - Sigma), Insulina (1ng/mL - Sigma), T3 (0,4ng/mL - Sigma), Glucagon (0,01ng/mL - Sigma), EGF (0,1ng/mL - Sigma), FGF (0,2ng/mL - Sigma), Penicillina (200U/mL – Gibco-BRL) e Streptomycina (10 μ g/mL – Gibco-BRL). Os tratamentos com EGF e FGF2 foram realizados nas primeiras 24h de cultura, nas concentrações de 10 e 20ng/mL, respectivamente. As culturas foram mantidas a 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade.

4.9- Imunocitoquímica

No sexto dia de cultura, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% (Sigma) e submetidas à marcação imunocitoquímica utilizando marcadores celulares específicos. O núcleo das células foi visualizado com o corante nuclear bis-benzimide (Hoescht 33342 - Sigma). Os melanócitos possuem seu próprio marcador, a melanina, facilmente identificável em microscopia de contraste de fase, além disso, foi utilizado o anticorpo monoclonal anti-marcador precoce de melanócitos (MeLEM - Developmental Studies Hybridoma Bank) que liga-se a células pré-melanocíticas (Lahav, *et al.*,

1996). As células gliais serão identificadas com o anticorpo monoclonal contra proteínas específica da bainha de mielina (SMP - Developmental Studies Hybridoma Bank), específico para célula de Schwann. Para identificar neurônios e células catecolaminérgicas, serão utilizados anticorpos monoclonais anti-beta tubulina III (marcador de neurônios; β III tub - Promega) e anti-tirosina hidroxilase (TyrOHase-células catecolaminérgicas – TH - Developmental Studies Hybridoma Bank) (Dupin *et al.*, 1995). Serão utilizados anticorpos secundários anti-IgG de camundongo ou coelho ligados à fluoresceína isotiocianato (FITC) ou tetrametilrodamina isotiocianato (TRITC) (todos Southern Biotechnology), conforme o experimento.

4.10- Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas pela análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo teste de Newmann-Keuls, ou pelo teste T de Student, quando necessário (Graph Pad Prism).

5- RESULTADOS

Parte I

5.1- A expressão forçada de *Hoxa2* na CNFE promove alterações no padrão molecular durante o desenvolvimento da cabeça

Com o intuito de verificar a influência do *Hoxa2* na expressão de alguns morfógenos importantes para o desenvolvimento crânio-facial, foram realizados experimentos de ganho de função para *Hoxa2* especificamente na CNFE. Numa primeira série de experimentos *in vivo*. A CN de embriões de *Gallus gallus*, compreendida entre o diencéfalo e o r2 – domínio da CN que normalmente não expressa quaisquer genes Hox, chamado de CNFE, foi bilateralmente eletroporada com uma construção baseada num vetor viral: *Hoxa2*-RCAS. Após eletroporação, somente a região da borda neural foi cirurgicamente removida e implantada em um embrião hospedeiro, previamente preparado, exatamente na mesma região e de mesmo estágio de desenvolvimento. Dessa maneira, a expressão forçada de *Hoxa2* ficaria restrita às células da CNFE (*CNFE-Hoxa2*⁺) (Fig. 09). Isso permite uma análise precisa dos efeitos da expressão forçada de *Hoxa2* somente nas células da CN.

5.1.1- Análise da proliferação e migração da CN em embriões *CNFE-Hoxa2*⁺

Creuzet e colaboradores (2002) demonstraram que embriões *CNFE-Hoxa2*⁺ não apresentam desenvolvimento de estruturas crânio-faciais derivadas da CN. Com o objetivo de verificar se tal fenômeno não estaria acontecendo simplesmente pelo fato da CN não estar migrando ou até mesmo morrendo, o padrão geral de proliferação e a migração das células da CN foram analisados 24h depois da microcirurgia acima descrita. Para isso, foram utilizados anticorpos específicos contra histona fosforilada H3 (phH3 – marcador de células em proliferação) e HNK1 (marcador de células da CN), numa reação de imunofluorescência em embriões inteiros de 20-25ss (correspondentes a 24hs após a manipulação) (Fig. 10).

O padrão de migração das células da CN nos embriões controle (embriões submetidos a todos os procedimentos de eletroporação e microcirurgia, porém com um plasmídeo irrelevante) mostrou que as células da CNFE povoaram o primeiro arco branquial (BA1), a região retro-ocular (Ro) e contornaram a vesícula óptica (VO) em direção a região naso-frontal (Nf) (Fig. 10, C). Na dupla-marcação com pH3 foi possível observar uma distribuição praticamente constante da atividade de proliferação celular em toda região da cabeça. Uma maior densidade de células proliferando foi observada na comissura maxilo-mandibular (Cmm), na região periocular, na placa basal do diencefalo, mesencéfalo (Mes) e na região neural anterior (ANR) (Fig. 10, E). Os embriões que tiveram a CNFE transfectada com *Hoxa2* (CNFE-*Hoxa2*⁺) apresentaram grandes alterações no desenvolvimento da cabeça. O tamanho da cabeça foi reduzido, com todas as vesículas encefálicas hipoplásicas (Fig. 10, B). Como consequência dos defeitos encefálicos, os embriões com CNFE-*Hoxa2*⁺ não apresentaram a típica expansão da cabeça no sentido rostral, ficando com a face plana (Fig. 10, B). Apesar dos defeitos apresentados, a migração das células da CN nos embriões CNFE-*Hoxa2*⁺ foi muito semelhante ao controle: o primórdio maxilo-mandibular foi normalmente colonizado (Fig. 10, D). O padrão de proliferação celular não apresentou alterações significantes, com exceção da região do BA1 que apresentou uma redução na densidade de células em proliferação (Fig. 10, F).

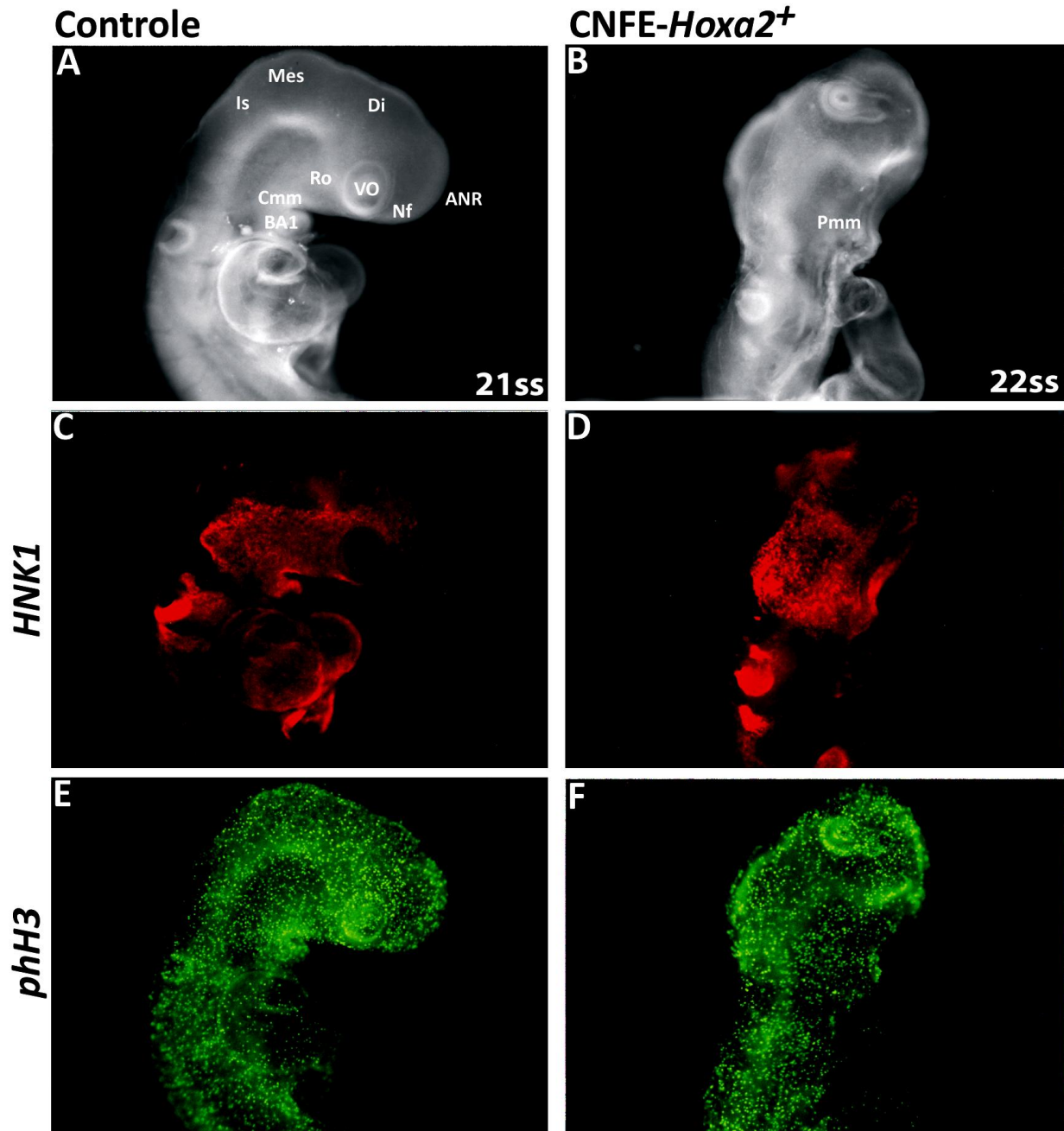


Figura 10: Perfil de migração das células da CN e proliferação celular geral em embriões CNFE-*Hoxa2*⁺. A expressão forçada de *Hoxa2* não altera o padrão de migração das células da CN (C. controle; D. CNFE-*Hoxa2*⁺), nem tão pouco o perfil geral de proliferação celular (E e F). Todavia, fortes alterações são perceptíveis no desenvolvimento do SNC e face. **BA1**. Primeiro arco branquial; **Ro**. Região retro-ocular; **VO**. Vesícula óptica; **Nf**. Região nasofrontal; **Cmm**. Comissura maxilo-mandibular; **Di**. Diencefalo; **Mes**. Mesencéfalo; **ANR**. Região neural anterior; **Is**. Ístimo; **Pmm**. Processos maxilo-mandibulares. Aumento 10x.

5.1.2- Influência da expressão ectópica de *Hoxa2* na CNFE sobre a expressão dos morfógenos, *Fgf8*, *BMP4*, *Shh* e *Wnt8b*

O *Fgf8*, *BMP4*, *Shh* e *Wnt8b* estão entre as principais moléculas conhecidas que participam da organização de toda região anterior durante o desenvolvimento embrionário. Como demonstrado, o ganho de função para *Hoxa2* nas células da CNFE provocam graves alterações crânio-faciais. Com o objetivo de verificar se embriões CNFE-*Hoxa2*⁺ apresentariam alguma alteração na expressão desses morfógenos, foram realizadas marcações para *Fgf8*, *BMP4*, *Shh* e *Wnt8b* em embriões CNFE-*Hoxa2*⁺ 24h depois do procedimento cirúrgico (Figura 11). Os embriões normais de 2,5 dias (E2,5 – embriões com 25ss, aproximadamente) apresentaram abundante transcrito para *Fgf8* na ANR, ístimo e ectoderme superficial dos arcos branquiais, como descrito por Crossley e colaboradores (1996) (Fig. 11, A). Quando *Hoxa2*-RCAS foi eletroporado na CNFE, a expressão de *Fgf8* foi reduzida na ANR e na ectoderme dos arcos branquiais (Fig. 11, B). A expressão de *BMP4* foi detectada na ectoderme maxilo-mandibular e na ectoderme temporo-nasal, após a transfecção de *Hoxa2* na CNFE, o acúmulo do transcrito para *BMP4* não foi significativamente alterado (Fig. 11, C, D). Em embriões normais o transcrito para *Shh* foi detectado restritamente na placa basal do neuroepitélio do mesencéfalo/prosencéfalo até o hipotálamo (Fig. 11, E). Os embriões CNFE-*Hoxa2*⁺ tiveram a expressão de *Shh* induzida na ectoderme da comissura maxilo-mandibular. Um grande aumento na expressão de *Shh* foi observado na endoderme do intestino anterior e na região da placa pré-cordal (Fig. 11, F). A expressão de *Wnt8b*, um marcador do desenvolvimento do tálamo dorsal e telencéfalo (Garcia-Lopez, *et al.*, 2004), apresenta-se distribuído na região dorsal da porção posterior do telencéfalo e porção anterior do diencéfalo nos animais controle (Fig. 11, G) e foi bastante reduzido no sentido ântero-posterior na linha mediana do prosencéfalo nos embriões CNFE-*Hoxa2*⁺ (Fig. 11, H).

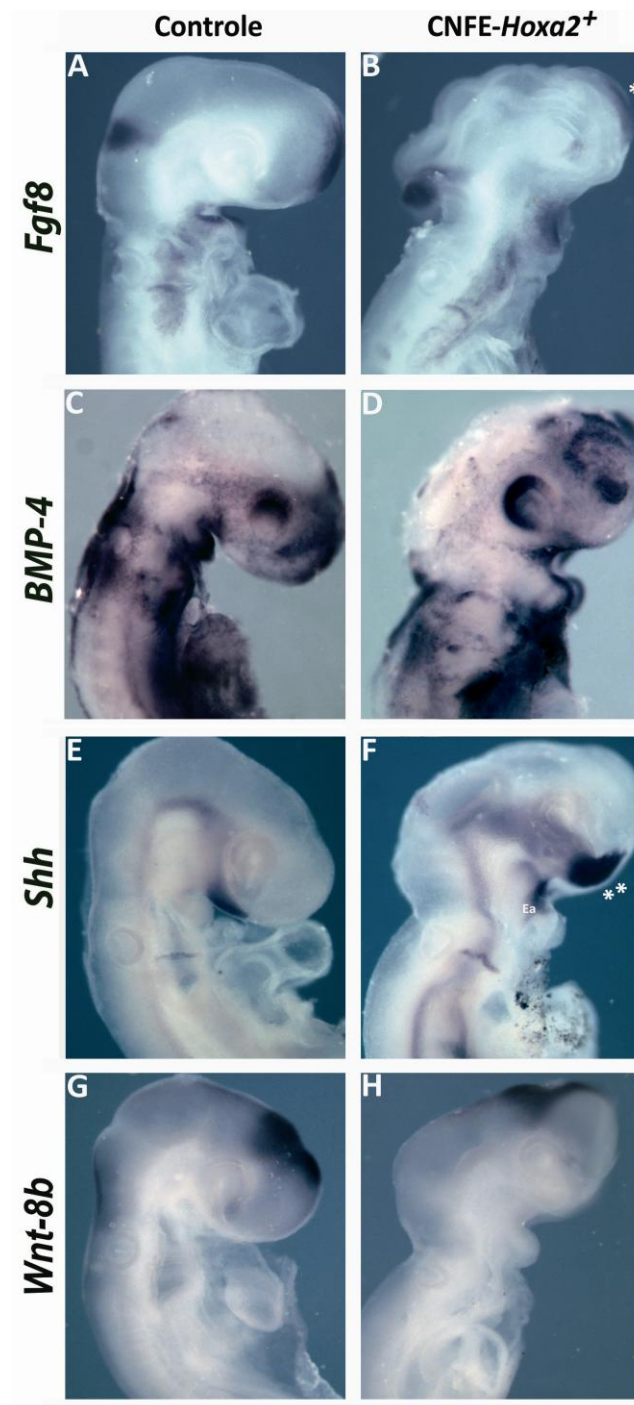


Figura 11: Influência da expressão forçada de *Hoxa2* na CNFE sobre a expressão de *FGF8*, *BMP4*, *Shh*, *Wnt-8b*. A expressão de *FGF8* na ANR (*) foi bastante reduzida (B) em relação ao controle (A). *BMP4* não apresentou alterações de expressão perceptíveis (B, C). *Shh* apresentou um grande aumento de expressão em toda placa pré-cordal (**), endoderme anterior (Ea) e comissura maxilo-mandibular. O domínio *Wnt-8b* também apresentou uma redução em relação ao controle (G), principalmente no sentido dorso-ventral (H). Aumento 10x.

5.1.3- Expressão ectópica de *Hoxa2* regula negativamente a expressão de antagonistas de BMP na FNSC

Dados recentes não publicados do grupo de Nicole Le Douarin sugerem que os antagonistas de BMP da CNFE atuam diretamente influenciando os níveis de expressão *Fgf8* na ANR e no ístimo. Esse mecanismo explica os defeitos no desenvolvimento do encéfalo observados após a ablação da CNFE (Creuzet *et al.*, 2006). Com base nesses dados nós lançamos a hipótese de que *Hoxa2* poderia estar regulando negativamente a expressão de *Noggin* na CNFE. Para verificar essa hipótese, realizamos hibridações em embriões inteiros. Observamos que durante o desenvolvimento normal, *Noggin* é expresso nas células migratórias da CN que colonizam os processos faciais (Fig. 12, A), como descrito anteriormente por Tzahor e colaboradores (2003) . Observamos ainda que a expressão ectópica de *Hoxa2* na CNFE reduziu drasticamente a expressão de *Noggin* nas células da CN migratória (Fig. 12, B).

Um perfil molecular das células da CNFE, que foram submetidas à eletroporação do vetor RCAS-*Hoxa2* e subseqüentemente cultivadas por 24h, foi obtido por análises de RT-PCR. Esses resultados confirmaram o efeito negativo do *Hoxa2* sobre a expressão de *Noggin* e *DAN*, ambos antagonistas de BMPs (Fig. 12, E). Foram também realizadas análises da expressão de *Cerberus*, um antagonista da via de TGF β , descrito como um potente indutor da formação da cabeça em *Xenopus* (Bouwmeester, *et al.*, 1996). Estudos baseados tanto nos ensaios de hibridização *in situ* quanto de RT-PCR , revelaram que *Cerberus* não é expresso na CN cefálica (Fig. 12, C). Interessantemente, a expressão de *Cerberus* é induzida após a transfecção da CNFE por *Hoxa2* (Fig. 12, D). A expressão de *Cerberus* foi ativada num determinado grupo de células da CN que formam um “crescente” de células positivas na região retro-ocular e maxilar (Fig. 12, D). Outro foco de células positivas para *Cerberus* também foi detectada na porção ventral do primórdio naso-frontal.

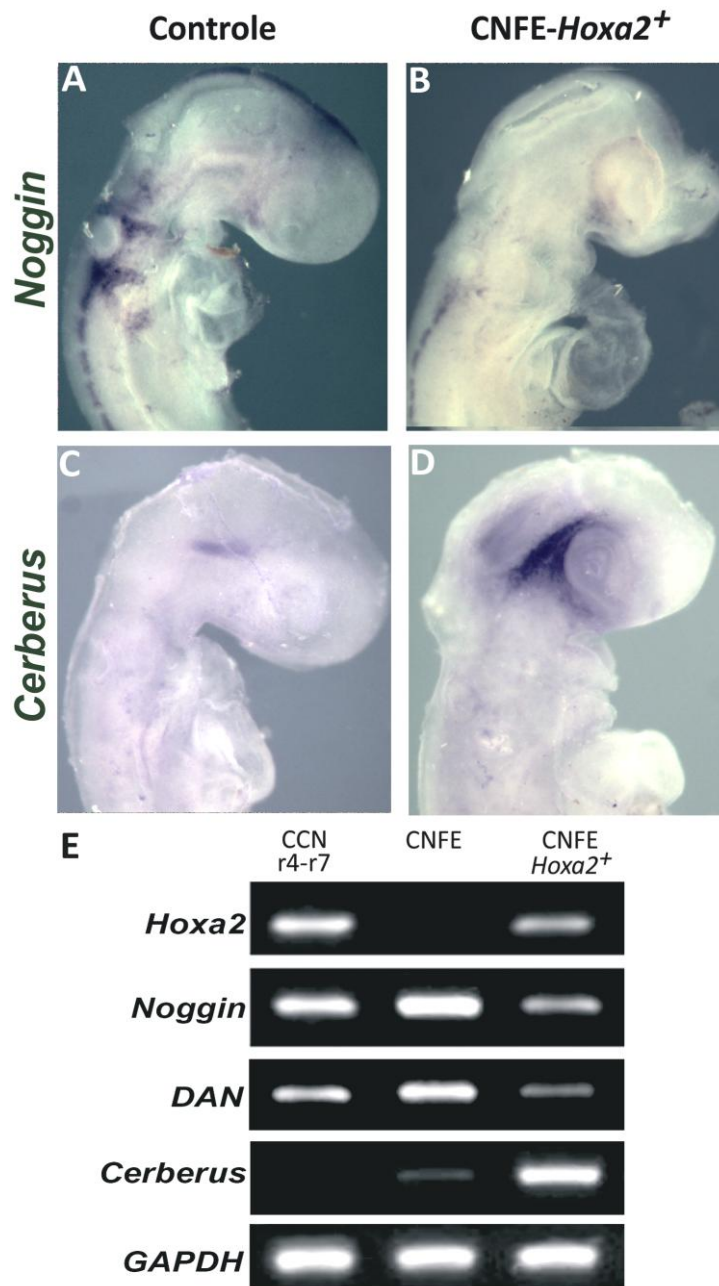


Figure 12: Efeito da expressão forçada de *Hoxa2* na CNFE sobre a expressão de *Noggin*, *Cerberus* e *DAN*. A expressão ectópica de *Hoxa2* na CNFE foi capaz de promover uma acentuada redução na expressão de *Noggin* pelas células da CN migratória na região cefálica (B). Todavia, a CNFE-*Hoxa2* apresentou um ganho de expressão de *Cerberus* na região retro-ocular e maxilar (C). Esses dados foram confirmados por análises de RT-PCR a partir de células da CNFE-*Hoxa2* isoladas (E). Além disso, foi verificado que *Hoxa2* foi capaz de promover redução na expressão de *DAN*, outro antagonista de BMP. Células da CN r4-r7 (CCN r4-r7) que naturalmente expressam genes *Hox* foram utilizadas a título de comparação. Aumento 10x.

5.2- O bloqueio na expressão de *Six2* na CNFE promove alterações morfológicas e moleculares semelhantes à expressão forçada de *Hoxa2*

Em camundongos na região do BA2 a expressão endógena de *Hoxa2* impõe um controle negativo sobre a expressão do fator de transcrição *Six2* (Kutejova *et al.*, 2005). Os processos morfogenéticos no BA2 são dependentes dessa balança entre esses dois fatores de transcrição – *Hoxa2/Six2* (Kutejova *et al.*, 2005; Kutejova *et al.*, 2008). Esses dados levaram-nos a explorar duas hipóteses: **1)** *Six2* poderia ser um gene alvo de *Hoxa2* quando este é ectopicamente expresso na CNFE; **2)** *Six2* seria capaz de controlar a expressão de antagonistas de BMPs e TGF β nas células da CNFE, a exemplo do que foi observado com *Hoxa2*.

5.2.1- Padrão de expressão de *Six2* durante o desenvolvimento da região anterior de embriões de *Gallus gallus*

Pouco se sabe sobre a expressão normal de *Six2* na região cefálica. Como primeiro passo para testar as hipóteses acima descritas, o padrão normal de expressão de *Six2* foi analisado durante o desenvolvimento da cabeça de *Gallus gallus*, do estágio de neurula até embriões com 5 dias (E5).

O padrão de expressão de *Six2* foi determinado utilizando ensaios de hibridização *in toto* e hibridizações *in situ*. O RNAm para *Six2* não foi detectado nos estágios compreendidos entre 5-16ss. Em embriões com 18ss foi possível observar um grupo de células da CN originárias do rombencéfalo anterior e localizadas nas proximidades do tubo neural (dados não mostrados). Em embriões com 24ss, *Six2* apresenta uma grande expressão nas proximidades dos futuros núcleos dos nervos trigêmeo, facial e vestibulo-acústico (Fig. 13, A). O Acúmulo do transcrito para *Six2* aumenta progressivamente com a idade do embrião. Ele é fortemente evidenciado na CN mesenquimal do BA1, processos retro-oculares e em menor intensidade no primórdio naso-frontal e BA2. Essa forte expressão foi evidenciada em embriões de até 4 dias de desenvolvimento. (Fig. 13, D). Análises histoquímicas mostraram que a expressão de *Six2* foi inicialmente detectada nos derivados mesenquimais da CN na região sub-ectodermal (13, B, E, G). A expressão de *Six2* foi também

detectada na endoderme faringeal E2,5 e nas porções mais distais das bolsas endodermiais (dados não mostrados). As vesículas óticas expressam *Six2* em suas porções ventrais (Fig. 13, C).

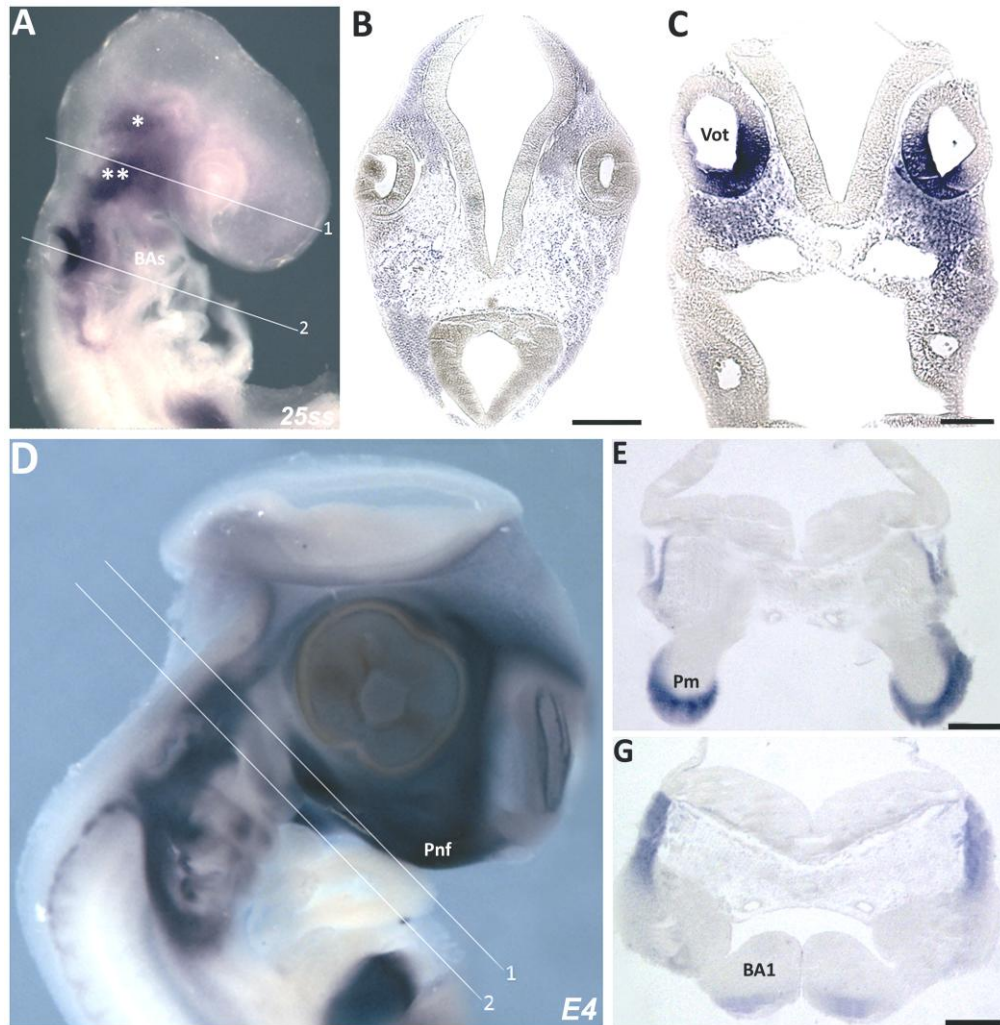


Figura 13: Padrão normal de expressão de *Six2* durante o desenvolvimento. Em embriões com 25ss – E2 (A), *Six2* é amplamente expresso no mesênquima da cabeça, principalmente nas porções mais ventrais (B e C), sendo fortemente expresso nas regiões dos prospectivos núcleos do trigêmeo e facial/vestibulo-acústico (A, *; **, respectivamente). Aos 4 dias de desenvolvimento (E4) a expressão de *Six2* aumenta (D), tornando-se amplamente distribuída por toda região cefálica no mesênquima sub-ectodermal principalmente (E e G). **BA**s. Arcos branquiais; **BA1**. Primeiro arco branquial; **Vot**. Vesícula ótica; **Pnf**. Processo nasofrontal; **Pm**. Primórdio maxilar. Barra=1mm.

5.2.2- A expressão endógena de *Six2* na CNFE é inibida pela expressão ectópica de *Hoxa2*

Após a constatação que a região anterior do embrião de *Gallus* expressa abundantemente *Six2*, foram realizados experimentos com o intuito de verificar se a expressão forçada de *Hoxa2* na CNFE provocaria alguma alteração na expressão de *Six2*, como a exemplo do que ocorre com a CN do BA2 (Kutejova *et al.*, 2005).

A expressão forçada de *Hoxa2* na CNFE foi capaz de inibir a expressão de *Six2* na região anterior dos embriões 24h após o procedimento (Fig. 14). Essa inibição é bem evidente tanto *in vivo* por hibridização (Fig. 14, A e B), quanto *in vitro* por análises de RT-PCR das células da CN (Fig 14 D).

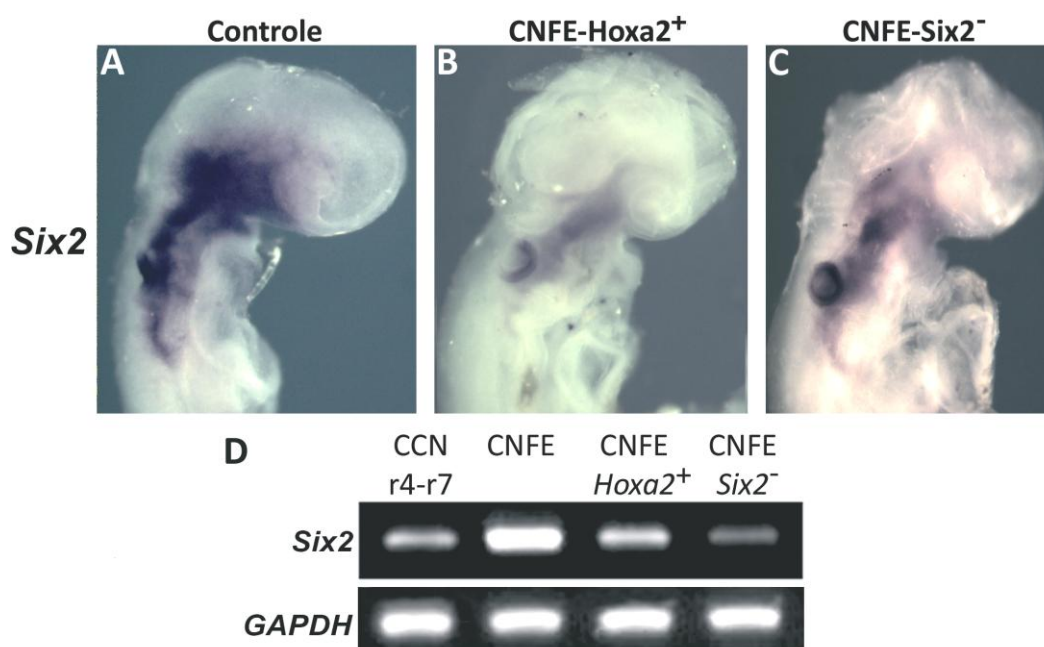


Figura 14: Efeitos da expressão forçada de *Hoxa2* e do bloqueio de *Six2*, sobre expressão de *Six2*. Após a eletroporação das células da CNFE com RCAS-*Hoxa2* ou com ds-*Six2*, a expressão de *Six2* é fortemente inibida, seja *in vivo* observado por hibridização *in toto* (B e C), ou *in vitro* observado por RT-PCR (D). Curiosamente, as alterações morfológicas apresentadas tanto pelos embriões *Hoxa2*⁺, quanto pelos embriões ds-*Six2*, foram praticamente às mesmas. Aumento 10x.

5.2.3- O bloqueio da expressão normal de *Six2* na CNFE promove alterações moleculares semelhantes à expressão forçada de *Hoxa2*

O controle negativo que *Hoxa2* confere sobre a expressão de *Six2*, na região cefálica, permite considerar a possibilidade que os efeitos observados com a expressão forçada de *Hoxa2* podem ser apenas parciais, devido à perda da expressão normal de *Six2* na CNFE. Para verificar tal hipótese, experimentos de perda de função para *Six2* foram realizados através da eletroporação na CNFE de uma seqüência de RNA de dupla fita (dsRNA) complementar ao RNAm para *Six2*. Essa técnica mostrou-se extremamente eficiente no bloqueio da expressão de *Six2* nas células da CNFE, tanto *in vivo*, observado por hibridização *in toto*, quanto *in vitro*, observado por RT-PCR (Fig. 14, C e D).

Analisando com um pouco mais de detalhamento o efeito da perda de função para *Six2* nas células da CNFE (CNFE-ds*Six2*), foi verificado que a embriões CNFE-ds*Six2* apresentam redução na expressão de *FGF8* na ANR e na ectoderme do BA1 (Fig. 15, B). O acúmulo do transcrito para *BMP4* não apresentou diferenças quando comparados aos embriões controle e mesmo CNFE-*Hoxa2*⁺ (Fig. 15, C e D; Fig. 11, C e D). O domínio de expressão de *Shh* mostrou-se consideravelmente aumentado na endoderme do intestino anterior e na região da placa pré-cordal, após a perda de função para *Six2*. Além disso, foi observada uma ativação na expressão de *Shh* na ectoderme da comissura maxilo-mandibular (Fig. 15, F). A perda de função para *Six2* também resultou numa redução na expressão de *Wnt8b* ao longo da região dorsal na linha mediana do prosencéfalo (Fig. 15, H). Os padrões gerais de expressão desses genes relacionados com o desenvolvimento da região cefálica apresentaram-se muito similares após a expressão forçada de *Hoxa2* ou a perda de função para *Six2* na CNFE. Esses dados podem indicar que os efeitos da expressão forçada de *Hoxa2* sobre esses morfógenos seriam devido à redução na expressão de *Six2* provocada por *Hoxa2*.

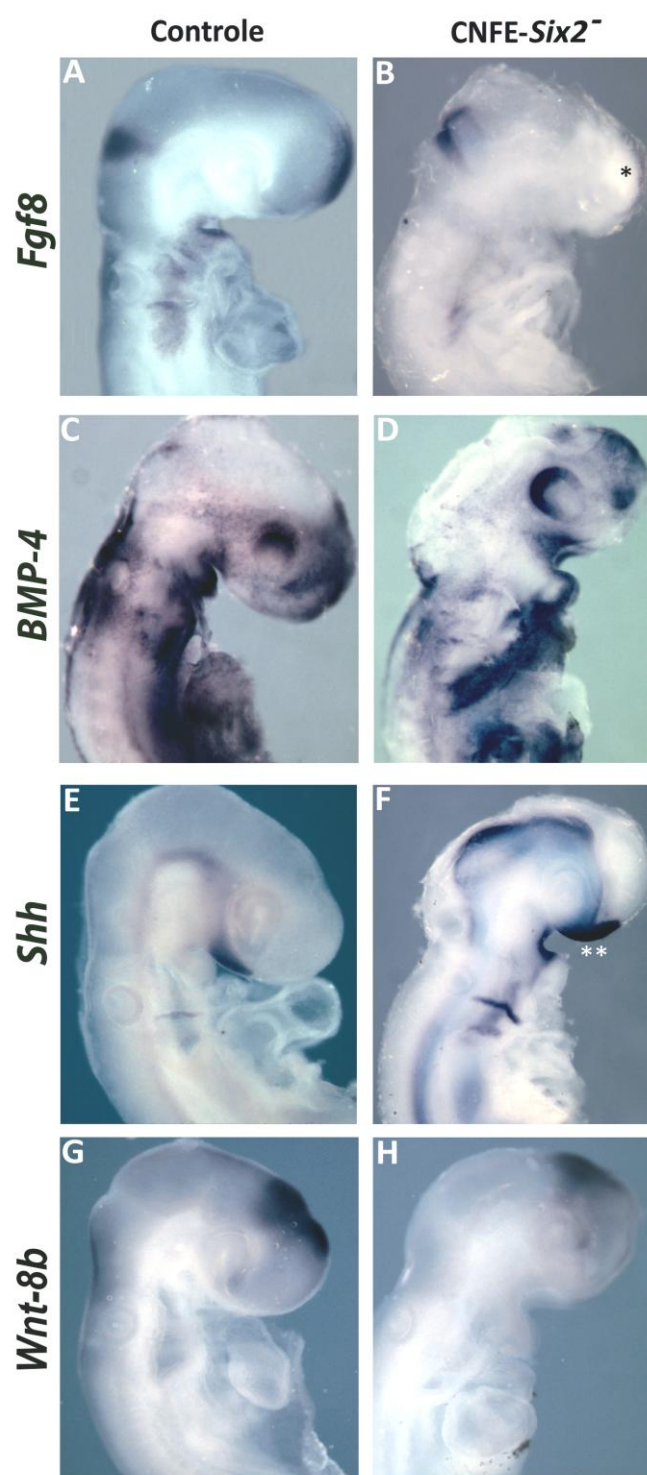


Figura 15: Efeito do bloqueio da expressão de *Six2* na CNFE sobre a expressão de *FGF8*, *BMP4*, *Shh*, *Wnt-8b* – hibridização *in toto*. A expressão de *FGF8* na ANR foi praticamente abolida (A*). *BMP4* não apresentou alterações perceptíveis de expressão. *Shh* apresentou um grande aumento de expressão em toda placa pré-cordal, endoderme anterior (**) e comissura maxilo-mandibular (F). O domínio *Wnt-8b* também apresentou certa redução, tanto no sentido ântero-posterior, quanto no sentido dorso-ventral em relação ao controle. Basicamente os mesmos fenótipos observados após o ganho de função para *Hoxa2* (Fig. 11). Aumento 10x.

A próxima questão torna-se eminente: o simples bloqueio na expressão de *Six2* exerce algum controle sobre a expressão de fatores secretados pelas células da CN, como antagonistas de BMPs e *Cerberus*? Para responder tal questão, embriões CNFE-ds*Six2* foram submetidos a marcações para *Noggin* e *Cerberus*, além disso, a expressão desses fatores também foi analisada em células isoladas da CNFE por RT-PCR. A expressão de *Noggin*, tanto por hibridização *in toto*, quanto por RT-PCR, mostrou-se fortemente inibida nas células da CN em migração na região cefálica, nos embriões CNFE-ds*Six2* (Fig. 16, B e D, respectivamente). A expressão de DAN, analisada por RT-PCR, também se mostrou fortemente reduzida nas células da CNFE-ds*Six2*. Surpreendentemente, a expressão de *Cerberus* também foi ativada num pequeno grupo de células da CN, como observado nos embriões CNFE-*Hoxa2*⁺. As células positivas para *Cerberus* foram detectadas no processo retro-ocular e no processo maxilar e na região ventral do primórdio nasofrontal (Fig. 16, D). A ativação de *Cerberus* nas células da CNFE-ds*Six2* foi confirmada por análises de RT-PCR de células da CNFE mantidas em cultura (Fig. 16, E).

De maneira geral, os padrões de expressão apresentados após a perda de função de *Six2* são praticamente idênticos aos obtidos com a expressão forçada de *Hoxa2* na CNFE (comparar Fig. 11 com 15 e 12 com 16). Esses dados confirmam a hipótese de que os efeitos observados com a expressão forçada de *Hoxa2* nas células da CNFE podem ser basicamente decorrentes do fato de *Hoxa2* estar inibindo a expressão endógena de *Six2*.

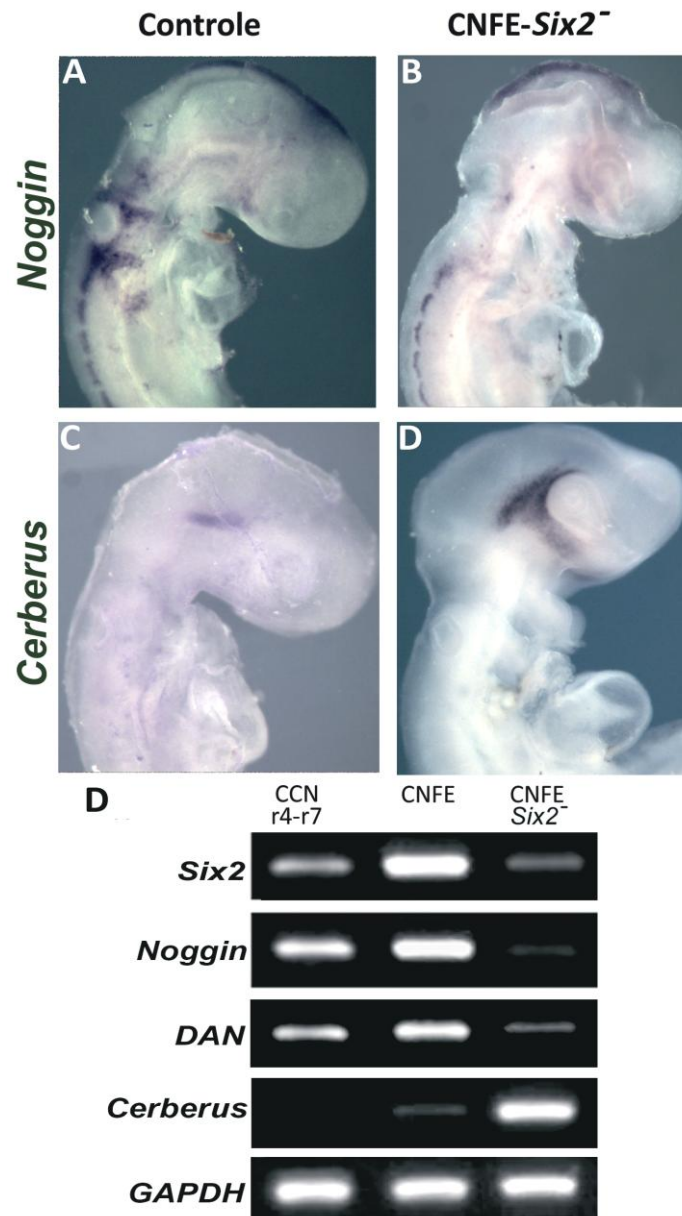


Figura 16: Influência do bloqueio da expressão *Six2* na CNFE sobre expressão de *Noggin*, *Cerberus* e *DAN*. O bloqueio da expressão de *Six2* na CNFE foi capaz de promover uma acentuada redução na expressão de *Noggin* nas células da CN migratória na região cefálica (B). Todavia, a CNFE-ds*Six2* apresentou um ganho de expressão de *Cerberus* na região retro-ocular e maxilar (C). Esses dados foram confirmados por análises de RT-PCR a partir de células da CNFE-*Six2* isoladas. Além disso, foi verificado que ds-*Six2* foi capaz de promover redução na expressão de *DAN*, outro antagonista de BMP. Fenótipo praticamente idêntico foi observado em embriões CNFE-*Hoxa2* (Fig. 04). Aumento 10x.

5.2.4- O bloqueio na expressão de *Six2* nas células da CNFE promove alterações no desenvolvimento do prosencéfalo

A expressão forçada de *Hoxa2* na CNFE promove graves alterações no desenvolvimento do SNC (Etchevers *et al.*, 1999; Creuzet *et al.*, 2006). Considerando os resultados até o momento, seria bem possível que esses efeitos fossem também devido à regulação negativa que *Hoxa2* confere sobre *Six2*. No entanto, deve-se levar em consideração que a eletroporação das células da CN com ds*Six2* provoca um bloqueio temporário na expressão de *Six2*, ao contrário da eletroporação com RCAS-*Hoxa2* que é permanente. Para compreender melhor as influências que *Hoxa2/Six2* causam no desenvolvimento do SNC, embriões CNFE-ds*Six2* foram mantidos vivos até o quinto dia de desenvolvimento (E5) e seus encéfalos foram cuidadosamente dissecados para análise morfológica. Nesses experimentos de perda de função para *Six2*, o neuroepitélio prosencefálico e mesencefálico não sofrem nenhum tipo de manipulação, todavia o desenvolvimento do prosencéfalo e do diencéfalo foi fortemente perturbado quando a CNFE não expressa *Six2*, mesmo que de maneira transitória (Fig. 17). Em embriões de 5 dias (E5) as vesículas cerebrais apresentam tamanho muito reduzido (Fig. 17). É visível que o desenvolvimento dorso-lateral do tálamo foi completamente abolido (Fig. 17, *). O desenvolvimento do telencéfalo também se apresenta fortemente reduzido (Fig. 17). Esses resultados sugerem que a alteração na expressão de antagonistas de BMP e *Cerberus* no momento específico onde a CNFE está em migração é fundamental para garantir o desenvolvimento futuro do SNC. A CN participará da formação da cabeça não apenas constituindo tecidos, mas também como uma fonte crucial de moléculas sinalizadoras para o desenvolvimento da cabeça.

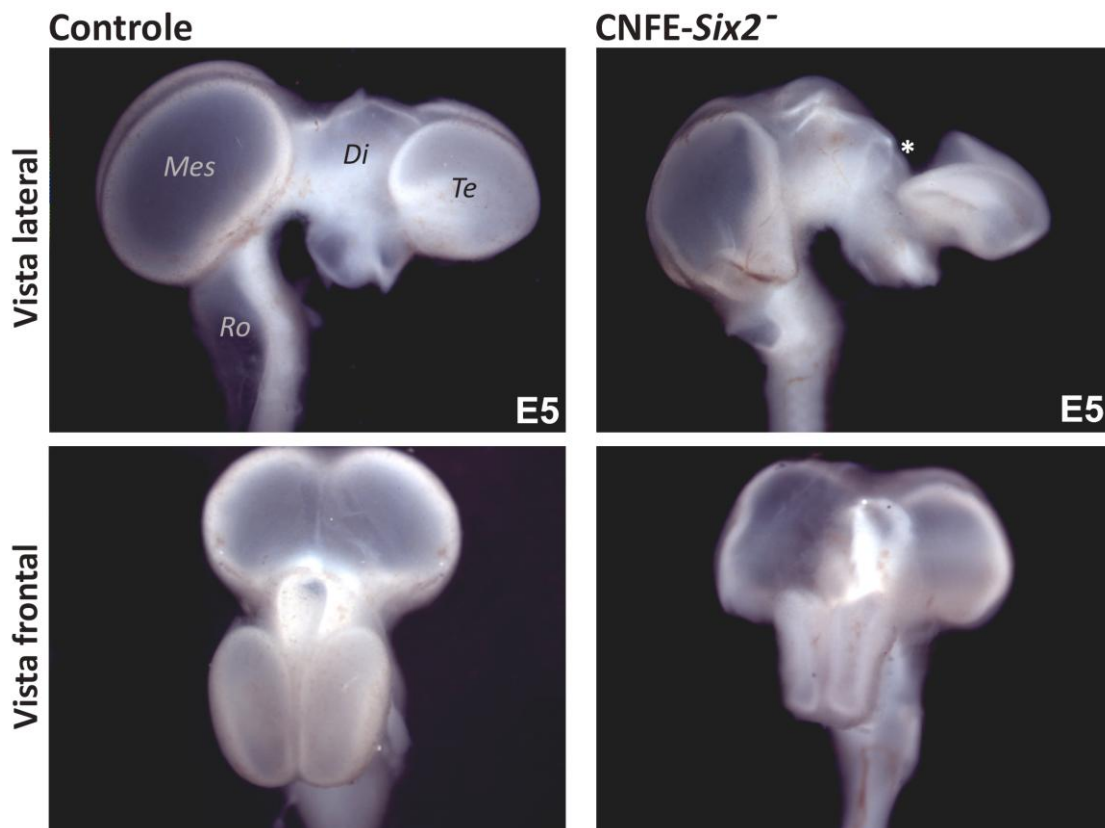


Figura 17: O bloqueio na expressão de *Six2* na CNFE provoca malformações no SNC. Encéfalos dissecados de embriões de 5 dias (E5) que tiveram a CNFE eletroporada para ds*Six2* apresentaram graves problemas no desenvolvimento do SNC, principalmente telencéfalo e diencefalo. O telencéfalo apresenta uma acentuada hipoplasia (direita) ficando com menos da metade do seu volume normal (esquerda). Além disso, toda a região do tálamo dorsal (*) e parte do tálamo ventral (subdivisões do diencefalo) não são formadas. Mesmo no mesencéfalo é possível observar certa hipotrofia. **Te.** Telencéfalo; **Di.** Diencefalo; **Mes.** Mesencéfalo; **Ro.** Rombencéfalo. Aumento 6x.

5.2.5- O bloqueio na expressão de *Six2* na CNFE promove malformações crânio-faciais

As células da CN participam diretamente na formação da maioria dos ossos e cartilagens da região cefálica. A expressão forçada de *Hoxa2* permanente é capaz de bloquear totalmente a diferenciação condrogênica na região cefálica (Creuzet *et al.*, 2002). Para verificar se um bloqueio na expressão de *Six2* na CNFE na fase migratória seria capaz de alterar a diferenciação condrogênica, embriões CNFE-ds*Six2* foram mantidos vivos até o sétimo dia e meio de desenvolvimento (E7,5) e submetidos a coloração específica para elementos condrogênicos (Fig. 18). Os embriões CNFE-ds*Six2* apresentaram várias alterações esqueletogênicas. Estes embriões apresentaram uma grande redução no desenvolvimento da cápsula fronto-nasal (Nf) e ausência completa da articulação maxilo-mandibular (cartilagens articular e quadrada, Q e Ar, respectivamente) e redução acentuada na porção proximal da cartilagem de Meckel (Mc, futura mandíbula). A mandíbula apresentou-se fortemente hipoplásica com nítidos problemas de diferenciação condrogênica, observada principalmente na cartilagem de Meckel (Fig. 18). É surpreendente que o bloqueio transitório na expressão de *Six2* na CNFE apresente efeitos consistentes mesmo em embriões de idades bem avançadas. Esses resultados sugerem que logo após o início do processo migratório, as células da CN que formarão ossos e cartilagens já apresentam determinação modulada pela expressão de *Six2*. Mais interessante ainda, essa determinação passa a ser irreversível no microambiente normal do desenvolvimento embrionário.

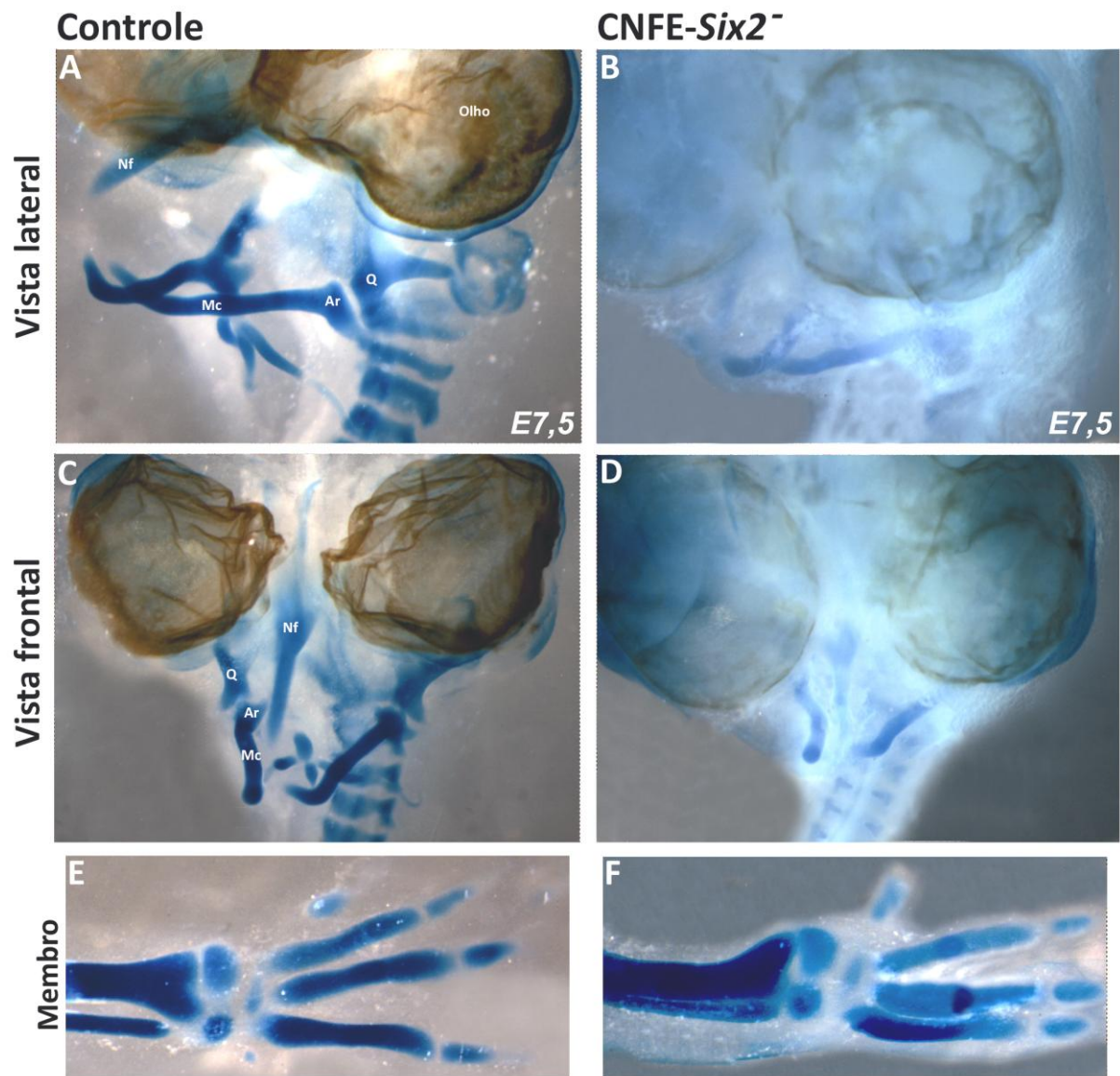


Figura 18: A redução na expressão de *Six2* pelas células da CNFE, durante a fase de migração, leva a malformações esqueletogênicas. Embriões CNFE-*dsSix2* corados com alcian blue, aos 7,5 dias de desenvolvimento (E7,5), apresentam a grande maioria dos ossos da face hipoplásicos, principalmente a cartilagem nasofrontal (**Nf**), as cartilagens quadrada (**Q**) e articular (**Ar**). A cartilagem de Meckel (**Mc**) chega a formar-se, no entanto com acentuados problemas na região proximal. **E e F.** Imagens dos respectivos membros inferiores, como controle da idade do embrião. Aumento 3x (A, B, C, D); aumento de 5x (E, F).

Parte II

5.3- A diferenciação das células da CN truncal pode ser modulada, in vitro, pela utilização de fatores de crescimento

Vários fatores de crescimento vêm sendo descritos como indutores de determinados fenótipos derivados da CN. Apesar de bastante estudados em outros sistemas, pouco se conhece sobre as funções do EGF e do FGF2 nos processos de diferenciação das células da CN. Utilizando um modelo de cultivo de células da CN, tratamentos em intervalos de tempo e concentrações específicas destes dois fatores de crescimento foram realizados com o intuito de entender melhor sua influência sobre os processos de diferenciação das células da CN da região truncal (CNT).

Tanto os tratamentos realizados com EGF, quanto os tratamentos realizados com FGF2 apresentaram efeitos consistentes sobre a diferenciação das células da CNT. Todavia, só foi possível observar estes efeitos quando os tratamentos foram realizados nas primeiras 24hs de um total de 6 dias de cultura.

As células pigmentares, fenótipo derivado da CN, diferem dos demais tipos celulares entre outras coisas, pela expressão do pigmento melanina. Essa característica confere a estas células uma particularidade, elas podem ser facilmente visualizadas em cultura pela sua coloração castanha escuro. Quando em alta densidade, essas células podem ser visualizadas macroscopicamente (Fig. 19, A). Utilizando-se dessa característica peculiar, analisamos a densidade total de melanócitos em cultura, após tratamento com EGF e FGF2, ambos apenas nas primeiras 24h da cultura. As células tratadas com EGF apresentaram um aumento de 2,6x na proporção de melanócitos (fator medido pela densidade óptica das culturas) (Fig. 19, B). Em contrapartida, o FGF2 promoveu uma redução de 2x nessa densidade melanocítica observada macroscopicamente (Fig. 19, B). EGF e FGF2 apresentaram efeitos opostos sobre a diferenciação dos melanócitos, mais interessante ainda, esses efeitos foram praticamente na mesma intensidade (em torno de 2x).

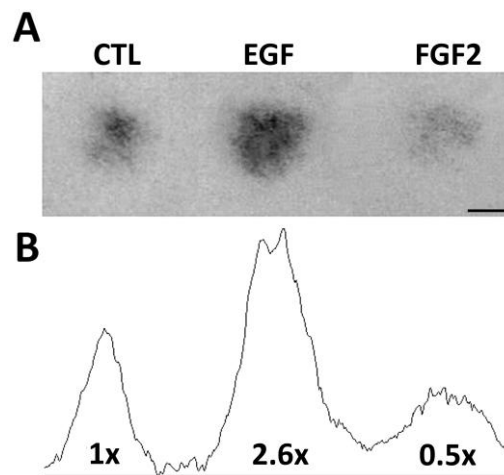


Figura 19: Visão macroscópica das células pigmentares derivadas da CNT em cultura (A). O tratamento com EGF nas primeiras 24h de cultura conduziu ao aumento das células pigmentares na ordem de 2,6x. Já o tratamento com FGF2 leva a uma redução desse tipo celular na ordem de 2x. Quantificação densitométrica da imagem A (B). Barra= 5mm

Dentre os principais derivados da CNT estão às células de Schwann, neurônios periféricos, melanócitos e, *in vitro*, células musculares lisas. Para proceder a uma análise mais criteriosa das influências do EGF e do FGF2 na diferenciação das células da CNT, foram realizadas imunomarcações com anticorpos específicos para neurônios (β III tub/TH⁺), células gliais (SMP⁺), células musculares lisas (α SMA⁺) e melanócitos (melanina⁺) (Fig. 20), seguida de quantificação por contagem direta destas células em microscópio de fluorescência (Fig. 21). O resultado das observações macroscópicas das células pigmentares foi confirmado pela quantificação direta em microscópio. Após tratamento com EGF, os melanócitos passaram a corresponder a 13% da população celular, isso representa um aumento de 2,8x em relação ao controle (Fig. 20, A, E, I, M; Fig. 21, A). Interessantemente, nesse tipo de avaliação, o tratamento com FGF2 não promoveu alterações na diferenciação das células pigmentares em relação ao controle. No entanto, o tratamento com EGF + FGF2 mostrou que o FGF2 tem a capacidade de inibir o efeito pró-melanocítico do EGF. Esses resultados vêm reforçar a idéia de que EGF e FGF2 teriam efeitos opostos sobre a diferenciação de melanócitos derivados da CNT (Fig. 21, A).

A proporção de células musculares lisas não foi alterada em nenhum dos tratamentos realizados (Fig. 20, B, F, J, N; Fig. 21, B). A maior proporção de células gliais foi observada após o tratamento com FGF2 (33%), isso representa um aumento de aproximadamente 2x quando comparado a todas as outras condições de cultura – controle, EGF, EGF + FGF2 (Fig. 20, C, G, K, O; Fig. 21, C). É importante perceber que no caso da glia (células de Schwann), o FGF2 apresenta efeito pró-gliogênico, todavia, a presença de EGF + FGF2 também é capaz de bloquear esse efeito. A exemplo do observamos com as células pigmentares, EGF e FGF2 apresentam efeitos opostos e são capazes de bloquear um o efeito do outro.

A população de neurônios representou 3,1 e 3,4% da população total das células após tratamento com EGF e EGF + FGF2, respectivamente, correspondendo a aumentos de 3,8 e 4x, respectivamente em relação ao controle (Fig. 20, D, H, L, P; Fig. 21, D). De todos os efeitos observados, o do EGF sobre a neurogênese foi o mais surpreendente. O EGF é capaz de promover um aumento na ordem de 4x na quantidade de neurônios em cultura e, além disso, ao contrário dos demais fenótipos analisados, esse efeito não pode ser inibido pela presença do FGF2 (Fig. 21, D). Esses dados sugerem que tanto EGF, quanto FGF2 agem, possivelmente, num mesmo progenitor determinando sua diferenciação para glia, ou para melanócitos. Além disso, o EGF pode atuar sobre outros progenitores determinando seu efeito pró-neurogênico.

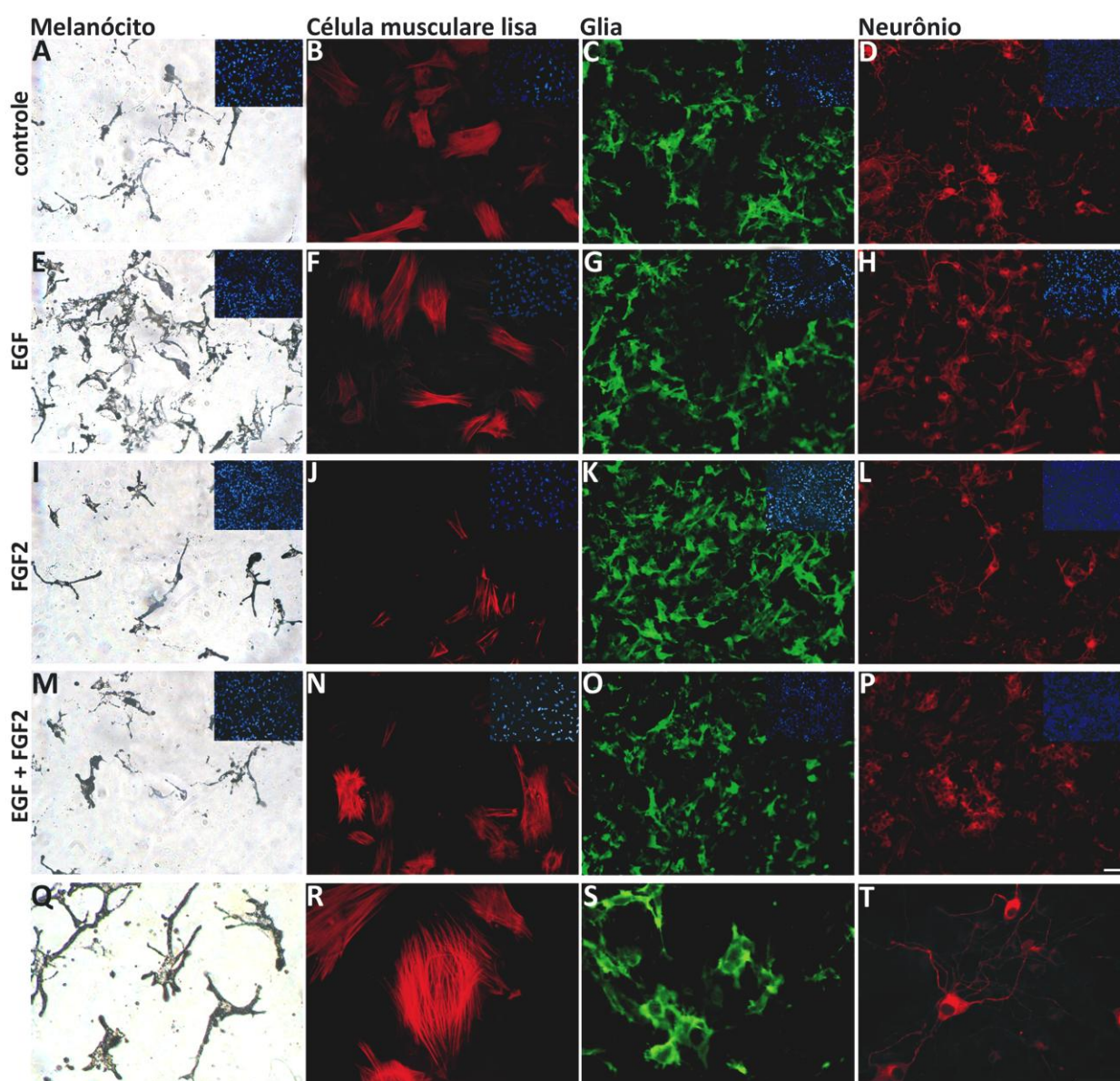


Figura 20: Imagem ilustrativa dos derivados da CNT após tratamento com EGF e/ou FGF2. Os tratamentos com EGF e FGF2 promovem alterações na diferenciação das células da CN tuncal *in vitro*, melanócitos (**A, E, I, M**), células musculares lisas (**B, F, J, N**), células gliais (**C, G, K, O**) e neurônios (**D, H, L, P**). O tratamento com EGF promoveu o aumento na diferenciação de melanócitos (**E**) e neurônios (**H**). FGF2 estimulou a diferenciação das células gliais (**K**). **Q, R, S, T** – melanócitos, células musculares lisas, células gliais e neurônios em maior aumento, respectivamente para evidências detalhes da marcação. Barra= 50µm.

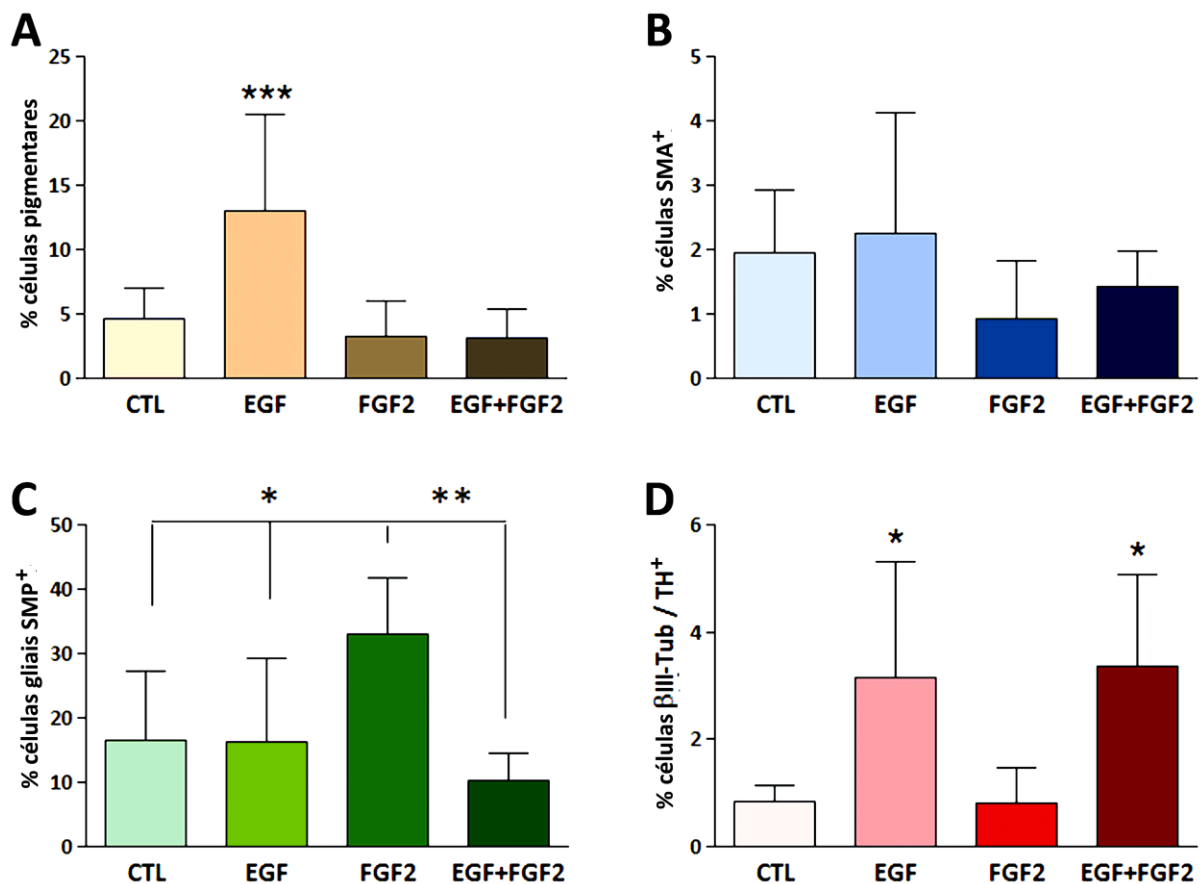


Figura 21: Análise quantitativa dos efeitos do EGF e FGF2 na diferenciação das células da CNT. Após a imunomarcagem, as células da CNT foram fotografadas em microscópio de epifluorescência e quantificadas por contagem direta das células totais e células marcadas. A partir desses valores foram calculadas as porcentagens de cada fenótipo. O EGF foi capaz de induzir o aumento na porcentagem de neurônios (3,8x; **D**) e melanócitos (2,8x; **A**). O FGF2 foi capaz de estimular o aumento nas células gliais na ordem de 2x (**C**). **A** – melanócitos; **B**- células musculares lisas; **C**- células gliais; **D**- neurônios. Diferenças significativas quando $p < 0,05$ - *; $p < 0,001$ **.

6- DISCUSSÃO

Parte I

No ano de 1890, Julia Platt, apesar de desacreditada em sua época, descreve pela primeira vez que a CN da região cefálica era a responsável pela formação de grande parte das cartilagens e ossos da cabeça. Quase 100 anos depois, Carl Gans e Glen Northcutt elaboraram a hipótese da “Nova-Cabeça”. Esses dois pesquisadores postularam que as principais inovações que permitiram o desenvolvimento do crânio e de uma mandíbula nos craniatas teriam sido o desenvolvimento de elementos cartilaginosos e ósseos na região cefálica. Gans & Northcutt (1983) propõem ainda, que o aparecimento da CN num cordado ancestral (semelhante ao moderno anfioxo) foi o ponto chave que permitiu o aparecimento da “nova-cabeça”. Desde então, os pesquisadores buscam compreender quais os mecanismos morfológicos e moleculares que permitiram a evolução dos modernos craniatas. Com os avanços nas técnicas e conhecimentos, a hipótese de Carl Gans e Glen Northcutt vem sendo sustentada.

Desde o início da gastrulação, o eixo ântero-posterior em todos os vertebrados já se encontra determinado. A expressão dos vários *clusters* dos genes *Hox* de maneira específica ao longo do eixo ântero-posterior é a grande responsável por essa orientação (Carroll, 1995). Interessantemente, a região anterior do embrião, que dará origem as estruturas cefálicas, não expressa quaisquer genes *Hox*. Essa ausência na expressão dos genes *Hox* na porção rostral do embrião define exatamente o limite entre a CN que apresenta potencialidade para formar ossos e cartilagens (CNFE) – *Hox* negativa e o restante da CN – *Hox* positiva (Kanzler, et al., 1998; Prince & Lumdsen, 1994; Creuzet, et al., 2002). Surpreendentemente, quando a expressão de genes *Hox* é forçada na CNFE, a capacidade de migração das células da CN não é alterada (Fig. 10), todavia o desenvolvimento dos ossos e cartilagens da região crânio-facial é altamente inibido (Etchevers, et al., 1999). Além disso, o desenvolvimento do telencéfalo é severamente prejudicado (Creuzet, et al.,

2002). Todos os vertebrados apresentam CN, mas somente os gnastostomados desenvolvem uma verdadeira mandíbula. Com base nesses dados, seria possível pensar na hipótese de que a perda na expressão dos genes *Hox* na região anterior e as conseqüentes alterações genéticas e moleculares decorrentes dessa, teria sido um dos passos evolutivos que viabilizou o desenvolvimento do crânio e da mandíbula nos vertebrados mandibulados.

A remoção cirúrgica da CNFE produz um efeito similar ao da expressão forçada de genes *Hox* nessas células. Em ambos os casos, a diferenciação condro-osteogênica na região da cabeça é fortemente prejudicada e o telencéfalo apresenta um desenvolvimento reduzido (Creuzet, *et al.*, 1999). O fato de a CNFE estar expressando genes *Hox* não interfere na sua capacidade de migração, nem tão pouco altera as regiões embrionárias que serão colonizadas por estas células (Fig. 10, D), todavia o fenótipo final é muito semelhante ao de um embrião que teve a CNFE removida. Esses dados podem fornecer um forte indicativo que as células da CNFE participam da formação crânio-facial não somente com células, mas também como um potente sistema de sinalização.

A expressão forçada de *Hoxa2* na CNFE leva a uma redução na expressão de *Noggin* nessas células na fase migratória tanto *in vivo*, quanto *in vitro* (Fig. 12, B). Apesar da expressão de *BMP4* produzido pela ectoderme, aparentemente, não ter alterado (Fig. 11, D), a redução na expressão de *Noggin*, um potente antagonista de BMP, por si só, poderia estar provocando um aumento de BMP4 livre. Essa expressão forçada de *Hoxa2* na CNFE também provoca uma forte supressão na expressão de *FGF8* na ANR (Fig. 11, A). Ohkubo, e colaboradores (2002) descrevem que o implante de micro-partículas liberadoras de BMP4, na região cefálica de embriões de *Gallus gallus*, provoca uma forte redução na expressão de *FGF8* na ANR e de *Shh* na placa pré-cordal, levando a uma redução no desenvolvimento do telencéfalo. É classicamente conhecido, que as regiões da ANR e ístimo funcionam como centros organizadores do desenvolvimento do SNC, sendo que o principal fator produzido nessas regiões é o FGF8 (Crossley *et al.*, 1996). Os efeitos da expressão forçada de *Hoxa2* na CNFE sobre a expressão de *Noggin*, *BMP4* e *FGF8*, permitem sugerir que as células da CNFE que passam a expressar *Hoxa2* têm a expressão de *Noggin* reduzida, isso leva a um aumento do BMP4

livre. Essa maior concentração de BMP4 inibe a expressão de *FGF8* na ANR. As alterações na homeostasia desses fatores seriam as responsáveis pelas más-formações crânio-faciais observadas (Fig. 17 e 18). A remoção cirúrgica da ANR provoca alterações crânio-faciais muito semelhantes às observadas nesses experimentos em embriões de 25ss (Etchevers, *et al.*, 1999; Creuzet, *et al.*, 2006). Esses dados tornam-se extremamente importantes, pois podem auxiliar na compreensão do porque teria sido necessário a perda da expressão dos genes *Hox*, na região embrionária anterior, para permitir o desenvolvimento da cabeça. No entanto, se considerarmos o desenvolvimento normal dos embriões de vertebrados, os genes *Hox* não são expressos na região anterior. Quais seriam então os mecanismos normais de controle do desenvolvimento crânio-facial? Qual seria o envolvimento da CN? Quais as relações destes com os genes *Hox*?

Kutenova e colaboradores (2005; 2008) realizaram experimentos com a CN de embriões de camundongo no desenvolvimento do BA2, região essa de alta expressão de *Hoxa2*. Estes autores observaram que o fator de transcrição *Six2*, normalmente com baixa expressão nessa região, era altamente expresso no BA2 de embriões com deleção do gene *Hoxa2* na CN. A região do BA2, em que a expressão de *Hoxa2* havia sido suprimida na CN, passou a mimetizar as formações ósseas características do BA1 (região *Hox*-negativa), ou seja, *Hoxa2* é capaz de inibir diretamente a expressão endógena de *Six2* na região do BA2 e com isso determinar o padrão de formações ósseas. Com base nesses dados, torna-se bastante atraente a hipótese de que os efeitos da expressão ectópica de *Hoxa2*, na região cefálica, sejam decorrentes de sua influência direta sobre *Six2*. A fim de testar tal hipótese, numa primeira série de experimentos, foi verificado se *Six2* era normalmente expresso na região cefálica. De fato, o mesênquima da cabeça, derivado da CN, expressa *Six2* em grandes quantidades (Fig. 13). Essa expressão de *Six2* esta associada mais intimamente às regiões sub-ectodermis colonizadas pelas células da CN (Fig. 13, E, F). De maneira muito interessante, a expressão de *Six2* nas células da CN, na região cefálica, foi quase totalmente inibida nos embriões CNFE-*Hoxa2*⁺ e *in vivo* e *in vitro* (Fig. 14, B). Esses resultados demonstram que *Hoxa2* é capaz de inibir a expressão de *Six2* na CN tanto da região do BA2 (Kutenova *et al.*, 2005; 2008), quanto da

região cefálica (Fig. 14, B), num sistema aparentemente bem conservado ao longo do eixo ântero-posterior do embrião. Diante destas evidências, uma questão se torna eminente: os efeitos observados após a expressão forçada de *Hoxa2* na CNFE são consequência direta da redução na expressão de *Six2*?

Utilizando um sistema de bloqueio de expressão, a partir de um RNA de dupla fita (ds-RNA) direcionado exclusivamente para *Six2*, foram obtidos embriões em que a expressão de *Six2* foi bloqueada exclusivamente na CNFE (CNFE-ds*Six2*). Morfologicamente, esses embriões, nas primeiras 24h, apresentaram as mesmas alterações que os embriões CNFE-*Hoxa2*: tamanho da cabeça foi reduzido, com todas as vesículas encefálicas hipoplásicas, embriões sem a típica expansão da cabeça no sentido rostral, ficando com a face plana. O padrão de migração das células da CN e as regiões que estas colonizam normalmente não apresentaram alterações. Interessantemente, os embriões CNFE-ds*Six2*, 24h após a manipulação, apresentam uma morfologia muito semelhante aos embriões CNFE-*Hoxa2* (Fig. 15) e aos embriões em que a CNFE foi removida cirurgicamente (Creuzet, *et al.*, 1999).

O bloqueio da expressão de *Six2* na CNFE foi igualmente capaz de reduzir a expressão de *Noggin* nas células da CN migratórias, tanto *in vivo*, quanto *in vitro* (Fig. 16). A expressão de *BMP4* não apresentou alteração (Fig. 15, D), todavia *FGF8* foi fortemente inibido na ANR (Fig. 15, B). O fator de transcrição *Six2* mostrou-se capaz de regular a expressão normal de *Noggin* nas células da CNFE durante as fases iniciais do desenvolvimento, regulando indiretamente a sinalização da ANR durante o desenvolvimento do SNC.

A expressão forçada de *Hoxa2* na CNFE inibe a expressão de *Six2* nessas células, modulando o padrão de expressão não somente de *Noggin*, mas de outros antagonistas de BMP como *DAN* e *Cerberus* (Fig. 16). A proteína DAN faz parte de uma grande família de antagonistas de BMP e apresenta os mesmo efeitos que *Noggin*. A proteína *Cerberus*, descrita como um antagonista da sinalização TGF β e um potente indutor da formação da cabeça em *Xenopus* (Bouwmeester, *et al.*, 1996), foi inicialmente identificada como um antagonista triplo de BMP, Wnt e Nodal (Piccolo, *et al.*,

1999). Recentemente, Yu, e colaboradores (2008) demonstraram que a proteína Cerberus pode também funcionar como um agonista de BMP e principalmente estimular a expressão de *Nodal* durante o estabelecimento do eixo direito-esquerdo em embriões de *Gallus gallus*. Na região cefálica a expressão de *Cerberus* desaparece logo após o fechamento do tubo neural, não sendo igualmente detectadas, na região cefálica, nas fases subseqüentes do desenvolvimento (dados não mostrados). Surpreendentemente, depois da expressão forçada de *Hoxa2* ou do bloqueio da expressão de *Six2* nas células da CNFE, a expressão de *Cerberus* foi ativada num pequeno grupo de células da CN na região retro-ocular, no processo maxilar e na região ventral do primórdio nasofrontal (Fig. 12 e 14). Esse ganho na expressão de *Cerberus* pode estar estimulando a expressão de *Nodal* e conseqüentemente conduzir ao aumento na expressão de *Shh* observado na placa pré-cordal tanto dos embriões CNFE-*Hoxa2*⁺, quanto dos embriões CNFE-ds*Six2* (Fig. 11 e 16). Isso explicaria porque, ao contrário do descrito por Ohkubo e colaboradores (2002), a expressão de *Shh* estar aumentada em nosso modelo.

Embriões ds*Six2*-CNFE com 7 dias apresentam nítidos problemas de diferenciação condrogênica, tais como: forte redução da cápsula fronto-nasal e completa ausência da articulação mandíbulo-maxilar. Creuzet, e colaboradores (2002) mostraram que a expressão forçada de genes *Hox* na CNFE reduz drasticamente a formação condro-osteogênica na região cefálica, chegando a completa ausência de ossos e cartilagem com a expressão de *Hoxa2*. A ausência, apenas parcial, de estruturas condro-osteogênicas observada nos embriões CNFE-ds*Six2* é resultado, provavelmente, de um efeito transitório do bloqueio de *Six2* (dsRNA), versus um estímulo permanente da expressão de *Hoxa2* (RCAS-*Hoxa2*). De maneira muito interessante, as regiões onde foi observado o ganho na expressão de *Cerberus* (Fig. 12, D; 15, D), coincidem exatamente com as regiões onde mais tarde foram evidenciados os problemas de diferenciação condro-osteogênica (comparar Fig 12, D e 13, D com 18) . A proteína Cerberus tem sido recentemente descrita como um potente inibidor da diferenciação osteogênica, mantendo essas células num estado indiferenciado Ideno, e

colaboradores. (2009). Essa característica de Cerberus poderia explicar, pelo menos em parte, as alterações condrogênicas observadas (Fig. 18)

Observando com maior atenção as alterações no desenvolvimento do SNC que o bloqueio da expressão de *Six2* na CNFE provoca, foi verificado, em SNC dissecados de embriões de 5 dias (E5), que as vesículas cerebrais apresentam-se hipoplásicas (Fig. 17). É visível que o desenvolvimento dorso-lateral do tálamo e foi completamente abolido. Retornando um pouco no desenvolvimento, percebe-se que apenas 24h após a eletroporação do ds*Six2* (E2,5) na CNFE, é possível observar uma redução acentuada na expressão de *Wnt8b* em todo domínio dorsal na região anterior do embrião (Fig. 15, H). O mesmo efeito pode ser observado em embriões CNFE-*Hoxa2* (Fig. 11, H). A expressão normal de *Wnt8b* em E2,5 é localizada no neuroepitélio dorsal do telencéfalo e tálamo (Fig. 11, G), justamente as regiões que apresentam problemas de desenvolvimento nos embriões CNFE-ds*Six2*. A manutenção da expressão de *Wnt8b* no SNC é fundamental para o correto desenvolvimento dessa região (Garcia-Lopez, *et al.*, 2004).

Esse grupo de resultados permite-nos pensar que além da perda na expressão de *Hox*, o ganho na expressão *Six2* na CN da região cefálica teriam sido passos evolutivos fundamentais que permitiram o desenvolvimento da “Nova Cabeça”. Não somente a presença da CN seria o grande passo evolutivo, pois todos os craniatas apresentam CN e, no entanto, somente os gnatostomados apresentam mandíbula.

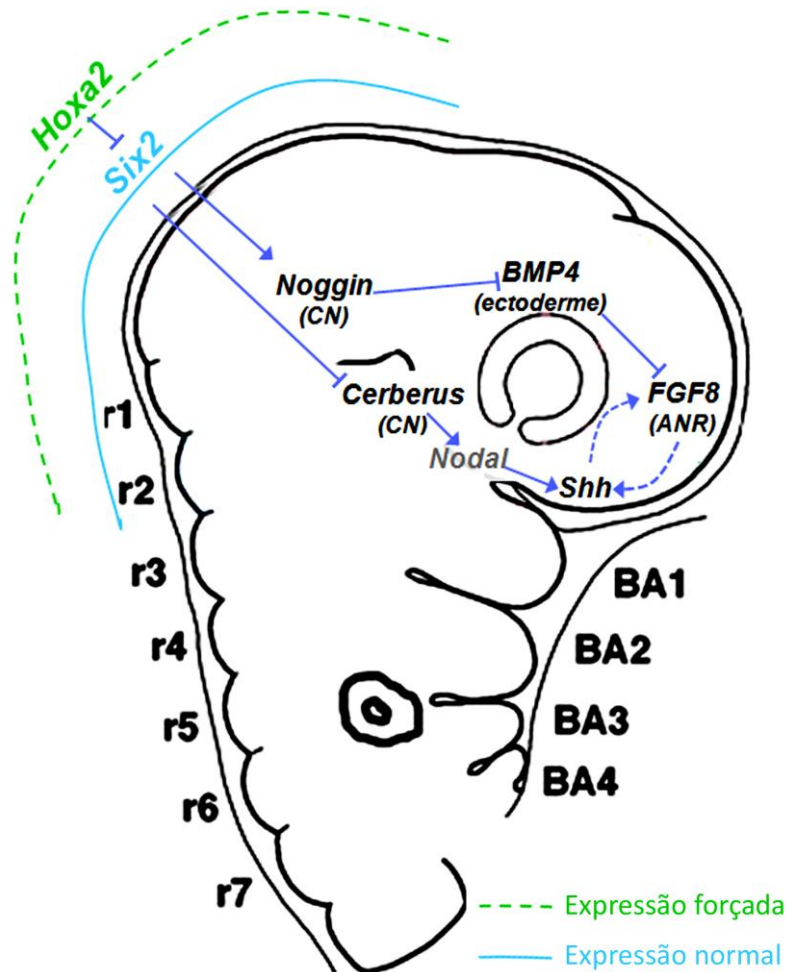


Figura 22. Esquema representativo do mecanismo de ação de *Six2* na CNFE e sua relação com *Hoxa2*. A expressão normal de *Six2* nas células da CNFE (traço azul) estimula a expressão de *Noggin* e *Cerberus* nas células da CNFE. O *Noggin* irá sequestrar *BMP4* inativando-o. A expressão de *FGF8* na ANR é sensível às variações na quantidade de *BMP4*. No caso de uma redução na expressão de *Six2*, quer seja por bloqueio de sua expressão (*dsSix2*), quer seja pela expressão forçada de *Hoxa2* (pontilhado verde) na CNFE, a expressão de *Noggin*, cairá, aumentando a quantidade de *BMP4* livre que, por sua vez, reduzirá a expressão de *FGF8* na ANR, levando ao aparecimento de defeitos na formação do SNC principalmente. Além disso, *Six2* é um supressor da expressão de *Cerberus* na CNFE. Reduzindo a expressão de *Six2* as células da CNFE passam a expressar *Cerberus* que provavelmente, induzirá a expressão de *Nodal*, estimulando o aumento da expressão de *Shh* na placa basal. Tanto o ganho de expressão de *Cerberus*, quanto o aumento na expressão de *Shh* podem interferir na diferenciação do SNC e dos elementos cartilaginosos.

Parte II

Gradientes de fatores de crescimento presentes em regiões específicas do embrião, juntamente com as características intrínsecas das células, são os responsáveis pela diferenciação das células da CN. BMPs 2/4 são capazes conduzir a diferenciação das células da CN para neurônios autonômicos simpáticos (Shah, *et al.*, 1996; Shah, *et al.*, 1997). Além disso, a neurogulina-1 e a ativação da sinalização Notch favorecem a gliogênese (Morrison *et al.*, 2000; Ijuin *et al.*, 2000). A presença de FGF2 durante a fase inicial de migração das células da CN *in vitro* é capaz de conduzir a diferenciação destas células para o fenótipo glial (Fig. 20; 21, C). Todavia, na presença de EGF, o fenótipo glial é desfavorecido, sendo o processo de diferenciação destas células conduzido aos fenótipos neuronais e melanocítico (Fig. 20; Fig. 21, D e A). Esses efeitos do FGF2 e EGF só foram observados quando os tratamentos foram realizados na fase inicial de migração das células da CN *in vitro*. Tratamentos realizados em outros intervalos de tempo não mostraram efeitos significativos (dados não mostrados). Surpreendentemente, quando ambos os fatores foram colocados juntos, o FGF2 mostrou-se um antagonista do efeito pró-melanogênico do EGF e, por sua vez, o EGF mostrou-se também um antagonista do efeito pró-gliogênico do FGF2. Mais interessante ainda, foi o fato da presença do FGF2 não interferir no efeito neurogênico do EGF (Fig. 21, D). Considerando que a população da CN que migra a partir do tubo neural é uma população mista, com progenitores de diversas potencialidades (Trentin *et al.*, 2004; Calloni *et al.*, 2007), esses fatores possivelmente atuam de maneira competitiva num progenitor misto glia-melanócito. O EGF é ainda capaz de determinar a diferenciação neurogênica atuando num progenitor não responsivo ao FGF2, provavelmente algum progenitor mais indiferenciado. Um sistema semelhante de sinalização foi descrito em progenitores da CN cefálica, onde sua capacidade de responder ao estímulo condrogênico do Shh é limitada a um intervalo de tempo específico, onde, provavelmente encontra-se a maioria dos progenitores responsivos a sinalização *hedghog* (Calloni, *et al.*, 2007).

O conhecimento dos processos de diferenciação das células da CN torna-se extremamente importante para que os estudos de inúmeros sistemas biológicos avancem. Resultados como estes, demonstrando as influências do FGF2 e do EGF sobre a diferenciação das células da CN, certamente contribuirão para uma maior compreensão da biologia das células da CN.

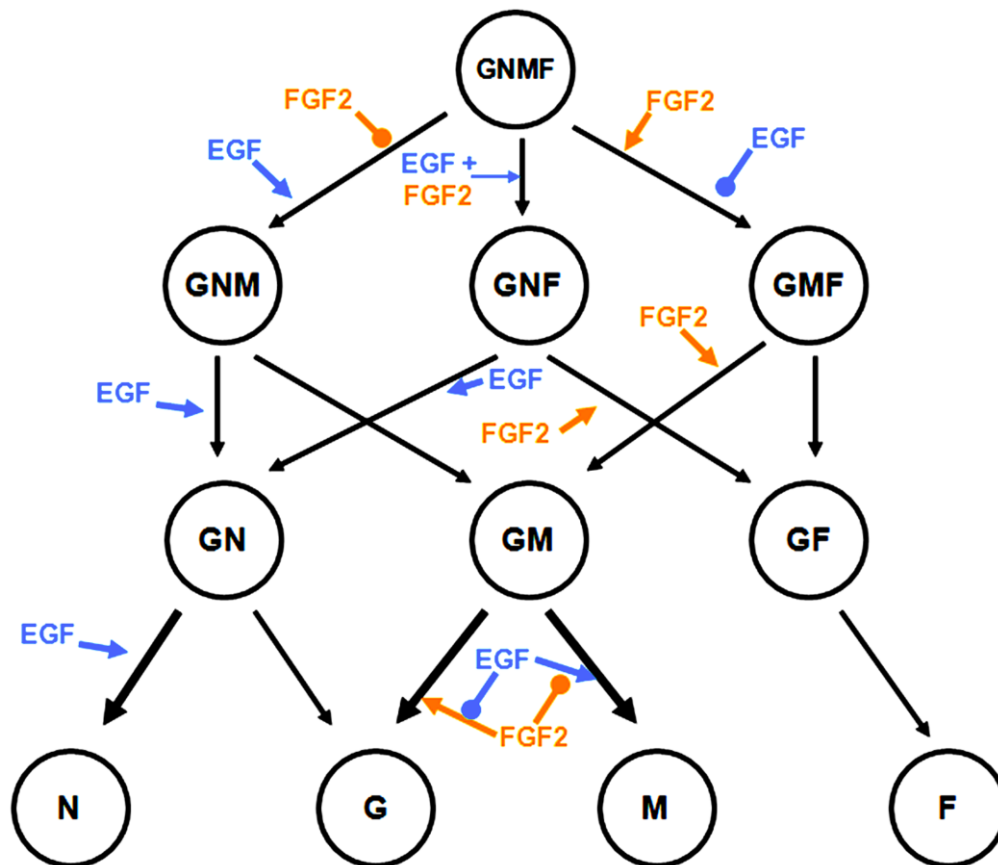


Figura 23. Efeitos do EGF e FGF2 sobre a diferenciação dos progenitores da crista neural truncal. O EGF apresenta um efeito de direcionamento para os fenótipos neuronais e melanocíticos, sendo que seu efeito pró-melanocítico é inibido pela ação do FGF2. O direcionamento para o fenótipo glial é realizado pelo FGF2, tendo seu efeito inibido pelo EGF. O efeito do EGF sobre a diferenciação neuronal não é afetado pelo FGF2. **Seta.** Efeito estimulatório; **Bola.** Efeito inibitório. Modificado de Trentin, *et al.*, 2004.

7- CONCLUSÕES

Os resultados expostos nesse trabalho demonstram, pela primeira vez, que a CN responsável pela formação dos ossos e cartilagens da cabeça expressa o fator de transcrição *Six2*. A expressão de *Six2* é inibida pela expressão forçada de *Hoxa2* nas células da CNFE. *Six2*, nas células da CNFE, é capaz de controlar a expressão de antagonistas de BMPs, como Noggin e DAN, controlando, portanto, a biodisponibilidade de BMP4 e, indiretamente, a expressão de *FGF8* na ANR. Esse cenário molecular, por si, controla não somente o desenvolvimento crânio-facial, mas também o desenvolvimento do SNC. Além disso, é a primeira vez também que foi observado que *Cerberus* pode ser expresso pelas células da CN, tendo sua atividade relacionada a problemas de desenvolvimento da cabeça.

Esses resultados demonstram que as células da CN apresentam um papel fundamental do desenvolvimento crânio-facial, não somente contribuindo com células que formarão o esqueleto facial, mas também como um potente centro sinalizador, capaz de participar na coordenação do desenvolvimento do SNC.

Na região truncal do embrião, os fatores de crescimento EGF e FGF2, mostraram-se capaz de modular a diferenciação das células da CN. Esses fatores formam um sistema sofisticado de determinação dos fenótipos derivados da CN, agindo, dependendo do progenitor envolvido, com efeitos opostos ou sinérgicos na diferenciação de neurônios, células gliais e melanócitos.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKITAYA, T. & BRONNER-FRASER, M. (1992). Expression of cell adhesion molecules during initiation and cessation of neural crest cell migration. *Dev. Dyn.* **194**: 12-20.
- ALLARD, B., MAGLOIRE, H., COUBLE, M. L., MAURIN, J. C., BLEICHER, F. (2006). Voltage-gate sodium channels confer excitability to human odontoblasts: possible role in tooth pain transmission. *J. Biol. Chem.* **281**: 29002-29010.
- BAKER, C. (2008). The evolution and elaboration of vertebrate neural crest cells. *Curr. Op. Gen. Dev.* **18**: 536-543.
- BASCH, M. L., BRONNER-FRASER, M., GARCIA-CASTRO, M. I. (2006). Specification of the neural crest occurs during gastrulation and require *Pax7*. *Nature* **441**: 218-222.
- BOUWMEESTER, T., KIM, S., SASAI, Y., LU, B., DE ROBERTIS, E. M. (1996). Cerberus is a head-inducing secreted factor expressed in the anterior endoderm of Spemann's organizer. *Nature* **382**: 595-601.
- BRITO, J. M., TEILLET, M. A., LE DOUARIN, N. M. (2006). An early role for sonic hedgehog from foregut endoderm in jaw development: ensuring neural crest cell survival. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103(31)**: 11607-12.
- BRITO, J. M., TEILLET, M. A., LE DOUARIN, N. M. (2008). Induction of mirror-image supernumerary jaws in chicken mandibular mesenchyme by Sonic Hedgehog-producing cells. *Development* **135**: 2311-2319.
- BRONNER-FRASER, M & FRASER, S. E. (1988). Cell lineage analyses reveals multipotency of some avian neural crest cells. *Nature* **335**: 161-164.
- BRONNER-FRASER, M. (1986). Analysis of the early stages of trunk neural crest migration in avian embryos using monoclonal antibody HNK-1. *Dev. Biol.* **115**: 44-55.
- CAI, J., CHO, S. W., ISHIYAMA, M., MIKAMI, M., HOSOYA, A., KOZAWA, Y., OHSHIMA, H., JUNG, H. S. (2009). Chick tooth induction revisited. *J. Exp. Zool. B. Mol. Dev. Evol.* **In press**.
- CALLONI, G. W., C. GLAVIEUX-PARDANAUD, N. M. LE DOUARIN AND E. DUPIN. (2007). Sonic Hedgehog promotes the development of multipotent neural crest progenitors endowed with both mesenchymal and neural potentials. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **104**: 19879-19884.
- CARROLL, S. B., WEATHERBEE, S. D., LANGEHAND, J. A. (1995). Homeotic genes and the regulation and evolution of insect wing number. *Nature* **375(6526)**: 58-61.
- CHAI, Y. & MAXSON, R. E. (2006). Recent advances in craniofacial morphogenesis. *Dev. Dyn.* **235**: 2353-2375.
- COHN, J. M. (2002). Lamprey *Hox* genes and the origin of jaw. *Nature* **416**: 386-387.

- COULY, G., CREUZET, S., BENNACEUR, S., VINCENT, C., LE DOUARIN, N. M. (2002). Interactions between *Hox*-negative cephalic neural crest cells and the foregut endoderm in patterning the facial skeleton in the vertebrate head. *Development* **129**: 1061-1073.
- COULY, G., GRAPIN-BOTTON, A., COLTEY, P., LEDOUARIN, N. M. (1996). The regeneration of the cephalic neural crest, a problem revised: the regeneration cells originate from the contralateral or from anterior and posterior neural fold. *Development* **122**: 3393-3407.
- CREUZET, S., COULY, G., VINCENT, C., LE DOUARIN, N. M. (2002). Negative effect of *Hox* gene expression on the development of the neural crest-derived facial skeleton. *Development* **129**: 4301-4313.
- CREUZET, S., MARTINEZ, S., LE DOUARIN, N. M. (2006). The cephalic neural crest exerts a critical effect on forebrain and midbrain development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**: 14033-14038.
- CREUZET, S., SCHULER, B., COULY, G., LE DOUARIN, N. M. (2004). Reciprocal relationships between *Fgf8* and neural crest cells in facial and forebrain development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**: 4843-4847.
- CROSSLEY, P. H., MINOWADA, G., MACARTHUR, C. A., MARTIN. (1996). Roles for FGF8 in the induction, initiation, and maintenance of chick limb development. *Cell* **84**: 127-136.
- DONOGHUE, P. C. J., SANSOM, I. J., DOWNS, J. P. (2006). Early evolution of vertebrate skeletal tissues and cellular interaction, and the canalization of skeletal development. *J. Exp. Zool. B. Mol. Dev. Evol.* **306**: 278-294.
- DUPIN, E., ZILLER, C., LE DOUARIN, N. M. (1998). The avian embryo as a model in developmental studies: chimeras and *in vitro* clonal analysis. In *Current Topics in Developmental Biology* (ed. Ac. Press) pp. 1-35. Elsevier, Oxford, UK.
- ETCHEVERS, H. C., COULY, G., VINCENT, C., LE DOUARIN, N. M. (1999). Anterior cephalic neural crest is required for forebrain viability. *Development* **126**: 3533-3543.
- ETCHEVERS, H. C., VINCENT, C., LE DOUARIN, N. M., COULY, G. (2001). The cephalic neural crest provides pericytes and smooth muscle cells to all blood vessels on the face and forebrain. *Development* **128**: 1059-1068.
- EZIN, A. M., FRASER, S. E., BRONNER-FRASER, M. (2009). Fate map and morphogenesis of presumptive neural crest and dorsal neural tube. *Dev. Biol.* **In press**.
- FERRIER, D. E., MINGUILLON, C., HOLLAND, P. W., GARCIA-FERNANDEZ, J. (2000). The amphioxus *Hox* cluster: deuterostome posterior flexibility and *Hox14*. *Evol. Dev.* **2**: 284-293.
- GANS, C. & NORTHCUTT, R. G. (1983). Neural crest and the origins of the vertebrates: a new head. *Science* **220**: 268-274.
- GARCIA-CASTRO, M. I., MARCELLE, C., BRONNER-FRASER, M. (2002). Ectodermal Wnt function as a neural crest inducer. *Science*. **297**: 848-851.
- GARCIA-LOPEZ, R., VIEIRA, C., ECHEVARRIA, D., MARTINEZ, S. (2004). Fate map of the diencephalon and the zona limitans at the 10-somites stage in chick embryos. *Dev. Biol.* **268**: 514-530.

- GIBSON, A. W., BURKE, R. D. (1985). The origin of pigment cells in embryos of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Curr. Dev. Biol.* **107**: 414-419.
- GRAMMATOPOULOS, G. A., BELL, E., TOOLE, L., LUMSDEN, A., TUCKER, A. S. (2000). Homeotic transformation of branchial arc identity after *Hoxa2* overexpression. *Development* **127**: 5355-5365.
- GRAPIN-BOTTON, A., BONNIN, M. A., MCNAUGHTON, L. A., KRUMLAUF, R., LEDOUARIN, N. M. (1995). Plasticity of transposed rhombomeres: *Hox* gene induction is correlated with phenotypic modifications. *Development* **121**: 2707-2721.
- HALL, B. K. (1998). Germs layers and the germ-layer theory revisited: Primary and secondary germ layers, neural crest as a fourth germ layer, homology, demise of the germ-layer theory. *Evol. Biol.* **30**: 121-186.
- HALL, B. K. (1999). The neural crest in development and evolution. New York, USA: *Springer-Verlag* **1ed.**
- HAMBURGER, V & HAMILTON, H. L. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* **88**: 49-92.
- HAWORTH, K. E., HEALY, C., MORGAN, P. SHARPE, P. T. (2004). Regionalization of early head ectoderm is regulated by endoderm and prepatterns the orofacial epithelium. *Development* **131**: 4797-4806.
- HELMS, J. A. (2005). New insights into craniofacial morphogenesis. *Development* **132**: 851-861.
- HOLLAND, P. W. H. & GRAHAM, A. (1995). Evolution of regional identity in the vertebrate nervous system. *Perspect. Dev. Neurobiol.* **3**: 17-27.
- HUNT, P., GULISANO, M., COOK, M., SHAM, M. H., FAIELA, A., WILKINSON, D., BONCINELLI, E., KRUMLAUF, R. (1991). A distinct *Hox* code for the branchial region of the vertebrate head. *Nature* **353**: 861-864.
- IDENO, H., TAKANABE, R., SHIMADA, A., IMAIZUMI, K., ARAKI, R., ABE, M., NIFUJI, A. (2009). Protein related to DAN and cerberus (PRDC) inhibits osteoblastic differentiation and its suppression promotes osteogenesis in vitro. *Exp. Cell Res.* **315(3)**: 474-484.
- IDO, A. AND K. ITO. (2006). Expression of chondrogenic potential of mouse trunk neural crest cells by FGF2 treatment. *Dev. Dyn.* **235**: 361-367.
- IJUIN, K., K. NAKANISHI AND K. ITO. (2008). Different downstream pathways for Notch signaling are required for gliogenic and chondrogenic specification of mouse mesencephalic neural crest cells. *Mech. Dev.* **125**: 462-474.
- JEFFERY, W. R., CHIBA, T., KRAJKA, F. R., DEYTS, C., SATOH, N., JOLY, J-S. (2008). Trunk lateral cells are neural crest-like cells in the ascidian *Ciona intestinalis*: insights into the ancestry and evolution of the neural crest. *Dev. Biol.* **324**: 152-160.
- JEFFERY, W. R., STRICKLER, A. G., YAMAMOTO, Y. (2004). Migratory neural crest-like cells form body pigmentation in a urochordate embryo. *Nature* **431**: 696-699.

- KALCHEIM, C. (1989). Basic fibroblast growth factor stimulates survival of nonneuronal cells developing from trunk neural crest. *Dev. Biol.* **134**: 1-10.
- KANZLER, B., KUSCHERT, S. J., LIU, Y. H., MALLO, M. (1998). Hoxa-2 restricts the chondrogenic domain and inhibits bone formation during development of the branchial area. *Development*. **125(14)**: 2587-2597.
- KRULL, C. E., COLLAZO, A., FRASER, S. E., BRONNER-FRASER, M. (1995). Segmental migration of trunk neural crest: time-lapse analyses reveals a role for PNA-binding molecules. *Development* **121**: 3733-3743.
- KUBOTA, Y. AND K. ITO. (2000). Chemotactic migration of mesencephalic neural crest cells in the mouse. *Dev. Dyn.* **217**: 170-179.
- KURATAMI, S., NOBUSADA, Y., HORIGOME, N., SHIGETANI, Y. (2001). Embriology of the lamprey and evolution of the vertebrate jaw: insights from molecular and developmental perspectives. *Philos. Trans.R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **356**: 1615-1632.
- KUTEJOVA, E., ENGIST, B., MALLO, M., KANZLER, B., BOBOLA, N. (2005). *Hoxa2* downregulates *Six2* in the neural crest-derived mesenchyme. *Development* **132**: 469-478.
- KUTEJOVA, E., ENGIST, B., SELF, M., OLIVER, G., KIRILENKO, P., BOBOLA, N. (2008). *Six2* functions redundantly immediately downstream of *Hoxa2*. *Development* **135**: 1463-1470.
- LAHAV, R., C. ZILLER, E. DUPIN AND N. M. LE DOUARIN. (1996). Endothelin 3 promotes neural crest cell proliferation and mediates a vast increase in melanocyte number in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **93**: 3892-3897.
- LAHAV, R., DUPIN, E., LECOIN, L., GLAVIEUX, C., CHAMPEVAL, D., ZILLER, C., LE DOUARIN, N.M. (1998). Endotelin 3 selectively promotes survival and proliferation of neural crest-derived glial and melanocyte precursors *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**: 14214-14219.
- LE DOUARIN, N. M. & KALCHEIM, C. (1999). The neural crest. Cambridge, UK: *Cambridge University Press* **2ed**.
- LE DOUARIN, N. M. (2008). A Developmental patterning deciphered in avian chimeras. *Dev. Growth Differ. Suppl* **1**: S11-28.
- LEDOUARIN, N. M. & TEILLET, M-A. (1974). Experimental analyses of the migration and differentiation of neuroblast of the autonomic nervous system and of neuroectodermal mesenchymal derivatives, using a biological cell marking technique. *Dev. Biol.* **41**: 163-184.
- LEDOUARIN, N. M. (1969). Particularites du noyau interphasique chez la caille japonaise (*coturnix coturnix japonica*). *Bulletin Biologique* **3-4**: 436-452.
- LIEM, K. F., TREMML, G., ROELINK, H., JESSEL, T. M. (1995). Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm. *Cell* **82**: 969-979.
- LITSIOU, A., HANSON, S., RIJLI, F. M. (2005). A balance of FGF, BMP and WNT signalling positions the future placode territory in the head. *Development* **132**: 4051-4062.

- LÖFBERG, J., NYNAS MCCOY, A., OLSSON, C., JONSSON, L., PERRIS, R. (1985). Stimulation of initial neural crest cells migration in the axolotl embryo by tissues graft and extracellular matrix transplanted on microcarriers. *Dev. Biol.* **107**: 442-459.
- MAGLOIRE, H., COUBLE, M-L., ROMEAS, A., BLEICHER, F. (2004). Odontoblast primary cilia: facts and hypotheses. *Cell Biol. Int.* **28**: 93-99.
- MALLAT, J. (2008). The origin of the vertebrate jaw: Neoclassical ideas versus newer, development-based ideas. *Zoolg. Sci.* **25**: 990-998.
- MEULEMANS, D & BRONNER-FRASER, M. (2004). Gene-regulatory interactions in neural crest evolutions and development. *Dev. Cell* **7**: 291-299.
- MEULEMANS, D., BRONNER-FRASER, M. (2007). Insights from amphioxus into the evolution of vertebrate cartilage. *PLoS ONE*. **2**: e787.
- MINA, M. & KOLLAR, E. J. (1987). The induction of odontogenesis in non-dental mesenchyme combined with early murine mandibular arch epithelium. *Arch. Oral Biol.* **32**: 123-127.
- MORRISON, S.J., PEREZ, S. E., QIAO, Z., VERDI, J. M., HICKS, C., WEINMASTER, G., ANDERSON, D. J. (2000). Transient Notch activation initiates an irreversible switch from neurogenesis to gliogenesis by neural crest stem cells. *Cell* **101**: 499–510.
- MURPHY, M., K. REID, M. FORD, J. B. FURNESS AND P. F. BARTLETT. (1994). FGF2 regulates proliferation of neural crest cells, with subsequent neuronal differentiation regulated by LIF or related factors. *Development* **120**: 3519-3528.
- OHKUBO, Y., CHIANG, C., RUBENSTEIN, J. L. (2002). Antagonists of Wnt and BMP signaling promote the formation of vertebrate head muscle. *Genes Dev.* **17**: 3087-3099.
- OHKUBO, Y., CHIANG, C., RUBENSTEIN, J. L. (2002). Coordinate regulation and synergistic actions of BMP4, Shh and FGF8 in the rostral prosencephalon regulate morphogenesis of the telencephalic and optic vesicles. *Neuroscience*. **111**: 1-17.
- O'LEARY, D. D. & WILKINSON, D. G. (1999). Eph receptors and ephrins in neural development. *Curr. Opin. Neurobiol.* **9**(1): 65-73.
- OSÓRIO, L., TEILLET, M. A., PALMEIRIM, I., CATALA, M. (2009). Neural crest ontogeny during secondary neurulation: a gene expression pattern study in the chick embryo. *Int. J. Dev. Biol.* **In press**.
- OTA, M., ITO, K. (2006). BMP and FGF-2 regulate neurogenin-2 expression and the differentiation of sensory neurons and glia. *Dev. Dyn.* **235**: 646–655.
- PEKARIK, V., BOURIKAS, D., MIGLINO, N., JOSET, P., STOEKLI, E. (2003). Screening for gene function in chicken embryo using RNAi and electroporation. *Nature Biotech.* **21**: 93-96.
- PETIOT, A., P. FERRETTI, A. J. COPP AND C. T. CHAN. (2002). Induction of chondrogenesis in neural crest cells by mutant fibroblast growth factor receptors. *Dev. Dyn.* **224**: 210-221.

- PICCOLO, S., AGIUS, E., LEYNS, L., BHATTACHARYYA, S., GRUNZ, H., BOUWMEESTER, T., DEROBERTIS, E. M. (1999). The head inducer *Cerberus* is a multifunctional antagonist of Nodal, BMP and Wnt signals. *Nature* **397**: 707-710.
- PRINCE, V & LUMSDEN, A. (1995). *Hoxa2* expression in normal and transposed rhombomeres: independent regulation in the neural tube and neural crest. *Development* **120**: 911-923.
- RYCHEL, A. L., SMITH, S. E., SHIMAMOTO, H. T., SWALLA, B. J. (2006). Evolution and development of the chordates: collagen and pharyngeal cartilage. *Mol. Biol. Evol.* **23**: 541-549.
- RYCHEL, A. L., SWALLA, B. J. (2007). Development and evolution of chordate cartilage. *J. Ex. Zoolog. B. Mol. Dev. Evol.* **308B**: 325-335.
- SANTAGATI, F. & RIJLI, F. M. (2003). Cranial neural crest and the building of the vertebrate head. *Nat. Rev. Neurosc.* **4**: 806-818.
- SARKAR, S., A. PETIOT, A. COPP, P. FERRETTI AND P. THOROGOOD. (2001). FGF2 promotes skeletogenic differentiation of cranial neural crest cells. *Development* **128**: 2143-2152.
- SCHMIDT, C., MCGONNELL, I., ALLEN, S., PATEL, K. (2008). The role of Wnt signalling in the development of somites and neural crest. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* **195**: 1-64.
- SELLECK, M. A. J. & BRONNER-FRASER, M. (1995). Origins of the avian neural crest: the role the neural crest plate epidermal interactions. *Development* **121**: 525-538.
- SHAH, N. M. AND D. J. ANDERSON. (1997). Integration of multiple instructive cues by neural crest stem cells reveals cell-intrinsic biases in relative growth factor responsiveness. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **94**: 11369-11374.
- SHAH, N. M., A. K. GROVES AND D. J. ANDERSON. (1996). Alternative neural crest cell fates are instructively promoted by TGFbeta superfamily members. *Cell* **85**: 331-343.
- SUZUKI, T., SAKAI, D., OSUMI, N., WADA, H., WAKAMATSU, Y. (2006). Sox genes regulate type 2 collagen expression in avian neural crest cells. *Dev. Growth Differ.* **48**: 477-486.
- TEILLET, M. A., KALCHEIM, C., LE DOUARIN, N. M. (1987). Formation of the dorsal root ganglia in the avian embryo: segmental origin and migratory behavior of neural crest progenitor cells. *Dev. Biol.* **120(2)**: 329-347.
- TEILLET, M. A., LAPOINTE, F., LE DOUARIN, N. M. (1998). The relationships between notochord and floor plate in vertebrate development revisited. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **95(20)**: 11733-11738.
- TEILLET, M-A., ZILLER, C., LEDOUARIN, N, M. (1999). Quail-chick chimeras in molecular embryology :Methods and protocols. *Methods in Molecular Biology* **97**: 305-318.
- TRENTIN, A. G.; GLAVIEUX-PARDANAUD, C.; LE DOUARIN, N. M.; DUPIN, E. (2004). Self-renewal capacity is a widespread property of various types of neural crest precursor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101(13)**: 4495-500.

- TZAHOR, E., KEMPF, H., MOOTOOSAMY, R.C., POON, A. C., ABZHANOV, A., TABIN, C.J., DIETRICH, S., LASSAR, A. B. (2003). Antagonists of Wnt and BMP signaling promote the formation of vertebrate head muscle. *Genes Dev.* **17(24)**: 3087-3099.
- VILHAIS-NETO, G. C., POURQUIÉ, O. (2008). Retinoic acid. *Curr. Biol.* **18(5)**: R191-192.
- WANG, H. U. & ANDERSON, D. J. (1997). Eph family transmembrane ligands can mediate repulsive guidance of trunk neural crest migration and motor axon outgrowth. *Neuron* **18**: 383-396.
- YU, J. K., HOLLAND, N. D., HOLLAND, L. Z. (2002). An amphioxus winged helix/forkhead gene *AmphiFoxD*: insights into vertebrate neural crest evolution. *Dev. Dyn.* **225**: 289-297.
- YU, X., HE, F., ZHANG, T., ESPINOZA-LEWIS, R. A., LIN, L., YANG, J., CHEN, Y. (2008). Cerberus functions as a BMO agonist to synergistically induce *Nodal* expression during left-right axis determination in the chick embryo. *Dev. Dyn.* **237**: 3613-3623.
- ZHANG, X., BOOT-HANDFORD, R. P., HUXLEY-JONES, J., FORSE, L. N., MOULD, A. P., ROBERTSON, D. L., LI, L., ATHIYAL, M., SARRAS, M. P. J. (2007). The collagen of *Hydra* provide insights into the evolution of metazoan extracellular matrices. *J. Biol. Chem.* **282**: 6792-6802.